

## 8. Kapitel

### Analyse des säurelöslichen Gehaltes an $\alpha$ -Lactalbumin und $\beta$ -Lactoglobulin in wärmebehandelter Milch

I. Clawin-Rädecker, C. Kiesner und E. Schlimme

#### 1. Einleitung

$\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin sind wie alle Molkenproteine globuläre Proteine mit einer komplexen Tertiärstruktur, die im nativen Zustand aufgrund ihrer hydrophilen Oberfläche in der Milch gelöst vorliegen.  $\alpha$ -Lactalbumin ist Bestandteil des Lactose-Synthese-Systems,  $\beta$ -Lactoglobulin stellt ein Transport- und Schutzprotein für hydrophobe Moleküle (Vitamin A) dar. Durch Hitzeeinwirkung erfolgt eine Auffaltung der komplexen Tertiärstrukturen der Molkenproteine, wobei hydrophobe, reaktive Molekülbereiche nach außen gelangen und an komplexen Aggregationsreaktionen beteiligt sind. Über nach außen gekehrte freie SH-Gruppen und Thioldisulfidaustausch-Mechanismen entstehen polymere Proteinkomplexe, die bei der isoelektrischen Fällung des Caseins kopräzipitieren. Es sind neben Aggregationskomplexen der Molkenproteine untereinander auch Aggregationen an  $\kappa$ -Casein oder an den Proteinen der MilCHFettkügelchenmembran beobachtet worden (1-5). Der komplexe und vielschichtige Prozeß der Molkenproteindenaturierung in der Milchmatrix kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Einflüsse des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Lactose- und Proteinkonzentration und des Casein/Molkenprotein-Verhältnisses konnte neben den Temperatur/Zeit-Verhältnissen der Erhitzung nachgewiesen werden (6).

Trotz der Komplexität der Molkendenaturierung ist die Charakterisierung der Wärmebehandlung von Milch über die Analyse des nicht denaturierten Anteils einzelner Molkenproteine möglich. In einer Reihe von Untersuchungen wurden  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin neben bovinem Blutserumalbumin (BSA) und den Immunglobulinen auf ihre Eignung als Hitzeindikatoren untersucht (7-14). Die einzelnen Molkenproteine weisen eine unterschiedliche Hitzestabilität auf. Die Immunglobuline und BSA sind sehr hitzelabil und werden schon unter Temperatur/Zeit-Bedingungen der Thermisierung und Pasteurisierung stark denaturiert.  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin weisen eine deutlich höhere Hitzestabilität auf. Besonders der säurelösliche Gehalt an  $\beta$ -Lactoglobulin wird als ein geeigneter Indikator zur Charakterisierung der Wärmebelastung angesehen. Eine Unterscheidung von hochpasteurisierter, ultrahocherhitzter und sterilisierter Milch aufgrund des  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes wird in der EU-Expertenkommission diskutiert. Im vorliegenden Kapitel wurde der säurelösliche Gehalt an  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin in unter definierten Prozeßbedingungen hergestellten Milchproben untersucht. Es wurde der gesamte Temperatur/Zeit-Bereich der Thermisierung, Pasteurisierung, Hoherhitzung, UHT-Erhitzung und Sterilisierung erfaßt, um so einen Erhitzungsbereich einzugrenzen, für den der Gehalt an säurelöslichem  $\alpha$ -Lactalbumin oder  $\beta$ -Lactoglobulin als Hitzeindikator geeignet ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Herstellung der Milchproben**

#### **2.1.1 Herstellung der PT-Milchproben**

Die Milchproben des Pasteurierungs- und Thermisierungsbereiches (PT) wurden aus unbehandelter Rohmilch einer Sammelmilch von ca. 30 Kühen (Morgengemelk, Fettgehalt 3,3 %) der Versuchsstation Schaedbek der Bundesanstalt für Milchforschung hergestellt. Auf eine Separierung, Einstellung des Fettgehaltes auf 3,5 % und anschließende Homogenisierung wurde verzichtet. Zur Wärmebehandlung wurde eine Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch eingesetzt. Die Erwärmung der Milch erfolgte über einen Spiralrohrerwärmer. Durch Einbau unterschiedlicher Heißhaltemodule wurden Heißhaltezeiten zwischen 15 sec und 80 sec bei Temperaturen von 62 °C bis 75 °C eingehalten. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die Milchprobe PT 1.4 wurde nicht in der Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch, sondern in einer 5l-Aluminium-Milchkanne durch Erwärmen im Wasserbad hergestellt. Die Milchproben wurden teilweise bis zur Analyse des Molkenproteingehaltes bei -18 °C gelagert.

#### **2.1.2 Herstellung der HE-Milchproben**

Die Herstellung der einzelnen HE-Milchproben erfolgte an 5 verschiedenen Versuchstagen. Die eingesetzte Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch von ca. 30 Kühen (Morgengemelk) der Versuchsstation Schaedtbek der Bundesanstalt für Milchforschung. Die Rohmilch wurde im Fettgehalt auf 3,5 % eingestellt und homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt. Zur Erwärmung der Milchproben wurde die unter 2.1.1 beschriebene Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch genutzt. Die für den Hoherhitzungsbereich eingehaltenen Temperatur/Zeit-Kombinationen lagen zwischen 85 °C bis 125 °C und Heißhaltezeiten von 5,3 sec bis 62,4 sec. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die separierte und homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen HE-Milchproben wurden teilweise bis zur Analyse des Molkenproteingehaltes bei -18 °C gelagert.

#### **2.1.3 Herstellung der UT-Milchproben**

Um einen möglichen Einfluß der Vorbehandlung der Milch zu erfassen, wurden im Ultrahoherhitzungsbereich Milchproben sowohl aus unbehandelter Rohmilch wie aus separierter und homogenisierter Ausgangsmilch hergestellt. Die eingesetzte Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch von ca. 30 Kühen (Morgengemelk, Fettgehalt: 3,73 %) der Versuchsstation Schaedtbek der Bundesanstalt für Milchforschung. Ein Teil der Rohmilch wurde homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt und anschließend wärmebehandelt (UT-Proben). Der andere Teil der Rohmilch wurde direkt ohne weitere Vorbehandlung erhitzt (RUT-Proben). Zur Erwärmung der

(RUT-Proben). Zur Erwärmung der Milchproben wurde die unter 2.1.1 beschriebene Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milch genutzt. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt. Die separierte und homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen HE-Milchproben wurden teilweise bis zur Analyse des Molkenproteingehaltes bei -18 °C gelagert.

#### **2.1.4 Herstellung der Sterilmilchen**

Bei der Herstellung der Sterilmilchen wurde ein Temperaturbereich von 110 °C bis 134 °C erfaßt. Es wurden Heißhaltezeiten von 100 sec bis 3000 sec eingehalten, die weit über die molkereiüblichen Sterilisierungsbedingungen hinausgehen. Die Herstellung der einzelnen Sterilmilchproben erfolgte an 5 verschiedenen Versuchstagen. Die eingesetzte Rohmilch stammte aus einer Sammelmilch von ca. 30 Kühen der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung. Die Rohmilch wurde im Fettgehalt auf 3,5 % eingestellt und homogenisiert. Die nach der Homogenisation ca. 70 °C heiße Milch wurde im Wasserbad auf 20 °C gekühlt, in Glasflaschen abgefüllt und im Autoklaven (Stock, Neumünster) bei den angegebenen Temperatur/Zeit-Kombinationen sterilisiert. Die separierte und homogenisierte Ausgangsmilch der einzelnen Versuchstage und die einzelnen Sterilmilchproben wurden teilweise bis zur Analyse des Molkenproteingehaltes bei -18°C gelagert.

## **2.2 Probenvorbereitung**

### **2.2.1 Probenvorbereitung der Milch**

In einem Erlenmeyerkolben werden 50 ml Milch mit 2 mol/l HCl auf pH 4,6 eingestellt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird bei 2000 g 20 min zentrifugiert. Das Serum wird über Faltenfilter und anschließend über 0,2 µm Membranfilter filtriert und in 100 µl Portionen bei -18 °C für mindestens 1 Tag eingefroren.

Nach dem Auftauen des Serums wird mit bidestilliertem Wasser je nach zu erwartender Konzentration an säurelöslichen Molkenproteinen im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 verdünnt. Das verdünnte Serum wurde bis zur Analyse bei ca. 7 °C gekühlt und innerhalb 24 h liquidchromatographisch analysiert. Einmal aufgetaute Proben wurden nicht weiter verwendet.

### **2.2.2 Probenvorbereitung des Referenzstandards**

Die Quantifizierung der analysierten Proben erfolgte durch Bezug auf einen Referenzstandard. Als Referenzstandard wurde eine gefriergetrocknete Rohmilch (von Prof. P. Resmini, Mailand, im Rahmen eines EU-Ringversuches zur Verfügung gestellt) eingesetzt. 2,5 g des gefriergetrockneten Referenzstandards werden in 10 ml bidestilliertem Wasser bei 40 °C gelöst, auf 25 ml aufgefüllt und wie unter 2.1.1 beschrieben vorbereitet.

### 2.2.3 Probenvorbereitung der Einzelstandards

Der Gehalt an säurelöslichen Molkenproteinen in der gefriergetrockneten Rohmilch wurde mithilfe reiner Einzelproteine (Sigma Chemie, Deisenhofen) bestimmt. Die lyophilisierten Proteine wurden in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml in 0,1 mol/l Phosphatpuffer pH 6,7 gelöst und bis zu Analyse tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Einzelstandardlösungen entsprechend der Konzentrationen im Referenzstandard verdünnt, 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen, zentrifugiert und im direkten Vergleich zum Referenzstandard analysiert. Die Einzelstandards erwiesen sich bis auf eine Substanz als chromatographisch (HPLC) rein. Der bei der Analyse von  $\beta$ -Lactoglobulin (genetische Varianten A+B) auftretende zusätzliche Peak entsprach 7,4 % der gesamten Peakfläche, so daß die bei der Auswertung zugrunde gelegte Einwaage von  $\beta$ -Lactoglobulin (A+B) um diesen Anteil reduziert wurde. Der Stickstoffgehalt der Einzelstandards wurde mittels Elementaranalyse (Mikroanalytisches Labor Pascher, Remagen) bestimmt und durch Bezug auf die Stickstoffgehalte der reinen Proteine (22) der Proteingehalt der Einzelstandards ermittelt.

### 2.3 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Apparatur: AutoSampler AS 4000, Intelligente Pumpe L 6200 A, Fluoreszenz Detektor F 1080 (Merck-Hitachi, Darmstadt); HPLC-Säulenofen 2155 (Pharmacia LKB, Freiburg); computergestütztes Nachintegrationssystem (PC Integration Pack Version 3.9, Kontron, Neufahrn).

Analytische Säule: PLRP-S 8  $\mu$ , 300 Å (Polymer Laboratories, Shropshire, UK), Säulentemperatur: 40 °C. Laufmittel A: 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v) (HPLC/Spectro Grade, Pierce, Rockford, Illinois, USA) in bidestilliertem Wasser; Laufmittel B: 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril (v/v) (LiChrosolv Acetonitril Gradient Grade, Merck, Darmstadt).

Gradientenprogramm: Anteile (%) an Laufmittel B in Laufmittel A (v/v) von 0-1 min 35 %, 1 - 8 min linear auf 38 %, 8 - 16 min linear auf 42 %, 16 - 22 min linear auf 46 %, 22 - 22,5 min linear auf 100 %, 22,3 - 23 min 100 %, 23 - 32,5 min linear auf 35 %. Nach jeder Analyse wird die analytische Säule 30 min mit 100 % Laufmittel B gespült und 30 min auf 35 % Laufmittel B rekonditioniert. Flußrate: 1,0 ml/min. Fluoreszenz-Detektion: Emission:  $\lambda = 320$  nm, Anregung:  $\lambda = 280$  nm. Aufgabevolumen: 10  $\mu$ l.

### 2.4 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Ausgangsmilchen erfolgte mittels Halbmikroverfahren nach Kjeldahl (VDLUFAMethodenbuch VI C 30.2).

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Bestimmung des säurelöslichen $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes in Milch mittels Reversed-Phase-HPLC

Die Bestimmung des säurelöslichen  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes in Milch erfolgte analog der von Resmini (7-8) entwickelten Analysenmethode. Es wird bei pH 4,6 eine isoelektrische Fällung des Caseins und der hitzedenaturierten Molkenproteine durchgeführt. Die in der sauren Molke gelöst vorliegenden nativen Molkenproteine können liquidchromatographisch an einer Polystyrol-Divinylbenzol-Polymerphase analysiert werden. Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm einer als Referenzstandard eingesetzten gefriergetrockneten Rohmilch.  $\alpha$ -Lactalbumin wird mit einer Retentionszeit von 9,8 min eluiert.  $\beta$ -Lactoglobulin kommt in Kuhmilch hauptsächlich in zwei genetischen Varianten A und B vor, die im Chromatogramm aufgetrennt und einzeln quantifiziert werden können (Retentionszeit von  $\beta$ -Lactoglobulin A: 19,8 min; Retentionszeit von  $\beta$ -Lactoglobulin B: 19,0 min). Geringe Mengen der genetischen Variante C werden von  $\beta$ -Lactoglobulin B nur ungenügend abgetrennt und daher als Summe mit  $\beta$ -Lactoglobulin B integriert und quantifiziert. Der Gehalt an säurelöslichem  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin A + B und der genetischen Varianten  $\beta$ -Lactoglobulin A und  $\beta$ -Lactoglobulin B wurde durch Vergleich mit reinen Einzelstandards bestimmt. Die Peakflächen der einzelnen Molkenproteinfraktionen konnten im Referenzstandard (10  $\mu$ l Aufgabevolumen des 1:10 verdünnten Serums) mit einem Variationskoeffizienten zwischen 1,5 % und 2,1 % je nach Protein bestimmt werden. Die Impräzision über vier Tage (Tag zu Tag-Analyse) erwies ebenfalls einen sehr niedrigen Variationskoeffizienten von 1,9 - 2,3 % je nach analysiertem Protein auf. Durch Verdünnung des Referenzstandards wurde die Linearität der Peakflächen über den gesamten relevanten Konzentrationsbereich wärmebehandelter Milch überprüft (Abb. 2). Lediglich im unteren Konzentrationsbereich (1:100 verdünnte Rohmilch entspricht 1,1 mg  $\alpha$ -Lactalbumin/100 ml bzw. 3,6 mg  $\beta$ -Lactoglobulin/100 ml) werden geringfügig erhöhte Peakflächen erhalten.

#### 3.2 Analyse der säurelöslichen $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalte in den Sterilmilchproben

Die liquidchromatographische Analyse der unter den Temperatur/Zeit-Bedingungen des Sterilbereiches hergestellten Milchen ergab lediglich in ST 1.1 und ST 2.1 eindeutig nachzuweisende Anteile an nicht denaturiertem Molkenprotein (Tab. 1). Die Nachweisgrenze von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin liegt bei 1,0 mg/100 ml. Die Milchprobe ST 1.1 (Prozeßtemperatur 110 °C, äquivalente Heißhaltezeit 13,8 s) ist aufgrund der geringen Wärmebelastung nicht mehr dem eigentlichen Sterilbereich zuzuordnen, sondern liegt im Bereich der Hoherhitzung. Trotzdem wird eine fast vollständige Denaturierung der Molkenproteine durch die Sterilisierung in Flaschen beobachtet. Der nicht denaturierte Anteil an  $\alpha$ -Lactalbumin in der Probe ST 1.1 liegt bei 15,2 % und von  $\beta$ -Lactoglobulin lediglich bei 0,4 %.  $\alpha$ -Lactalbumin sollte aufgrund seiner größeren Hitzestabilität für die Charakterisierung von stärker erhitzten Milchproben besser geeignet sein. Durch die Hitzebelastung wird jedoch die Peakform des  $\alpha$ -Lactalbumin deutlich verbreit-

tert (Abb. 3), so daß eine Intergration der Peakfläche erschwert wird. Diese Peakverbreiterung könnte auf während der Erhitzung ablaufende Maillard-Reaktionen zurückzuführen sein, die zu einer teilweisen „Glycosylierung“ des Proteins führen und die Retention verändern.  $\alpha$ -Lactalbumin wird daher zusammen mit dem bislang nicht näher charakterisierten Vorpeak (\*) (Retentionszeit 8,6 min) integriert, bei dem es sich möglicherweise um den nativ glycosylierten Anteil des  $\alpha$ -Lactalbumin handelt.  $\beta$ -Lactoglobulin ist auch bei stärkerer Erhitzung als Summenpeak der genetischen Varianten gut integrierbar, jedoch aufgrund seiner höheren Hitze-stabilität in Sterilmilch praktisch nicht mehr nachweisbar. In der EU-Expertenkommission wird daher eine Unterscheidung von UHT- und Sterilmilch aufgrund eines Grenzwertes von  $\beta$ -Lactoglobulin in UHT-Milch von über 5 mg/100 ml diskutiert. Die Reaktionskinetik der  $\beta$ -Lactoglobulin-Denaturierung bedingt eine asymptotische Annäherung des Denaturierungsgrades an die 100 %-Linie. Eine Erfassung der Hitzebelastung in diesem Bereich ist über die  $\beta$ -Lactoglobulin-Denaturierung daher schwierig (15).

### 3.3 Analyse der säurelöslichen $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalte in den UHT-Milchproben

Im Bereich der Ultrahocherhitzung wurde exemplarisch für eine Prozeßtemperatur in einer Pilotanlage indirekt erhitzte Milchproben hergestellt und auf ihren Gehalt an säurelöslichem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin untersucht. Die UHT-Milchen wurden bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C und äquivalenten Heißhaltezeiten von 4 - 23 sec hergestellt. Um den Einfluß der Homogenisierung und der damit verbundenen Wärmebelastung der Milchproben zu erfassen, wurden parallel zu Milchproben aus den homogenisierten Ausgangsmilchen mit einem Fettgehalt von 3,5 % (UT-Proben) auch Milchproben aus unbehandelter Rohmilch mit einem Fettgehalt von 3,3 % (RUT-Proben) hergestellt. In der homogenisierten Ausgangsmilch liegen bereits ca. 25 % an  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin denaturiert vor (Tab. 2). Trotz dieser deutlichen Vorschädigung der Ausgangsmilch werden nahezu identische  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalte in den UT-Proben (aus Ausgangsmilch) wie in den RUT-Proben (aus Rohmilch) gemessen (Tab. 3; Abb. 4 und 5). Der Einfluß der Hitzevorschädigung und der damit verbundenen unterschiedlichen Ausgangsgehalte ist im Vergleich zur indirekten UHT-Erhitzung unter den gewählten Versuchsbedingungen zu vernachlässigen.

$\alpha$ -Lactalbumin weist für eine Prozeßtemperatur von 140 °C eine höhere Hitze-stabilität als die genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulins auf. Selbst bei einem Sterilisationswert  $F_0$  von 30 min (Prozeßtemperatur 140 °C, 23 sec äquivalente Heißhaltezeit) werden ca. 20 mg nicht denaturiertes  $\alpha$ -Lactalbumin in 100 ml Milch nachgewiesen. Wie im Sterilbereich wird in den erhitzten UHT-Milchproben ebenfalls eine Verbreiterung des  $\alpha$ -Lactalbumin-Peaks möglicherweise aufgrund hitzeinduzierter Veränderungen am Protein (z.B. durch die Maillard-Reaktion) beobachtet.

Über die Hitzestabilität der einzelnen genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulin gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben (4,5,8,10,16), möglicherweise in Abhängigkeit des untersuchten Temperaturbereiches. Die für die Prozeßtempera-

tur 140 °C erhaltenen Ergebnissen lassen keine unterschiedlichen Hitzestabilitäten der genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulins erkennen.

Für die Unterscheidung von UHT- und Sterilmilch wird in der EU-Expertenkommission ein unterer Grenzwert für  $\beta$ -Lactoglobulin von 5 mg/100 ml in UHT-Milch diskutiert. Selbst bei Sterilisationswerten von  $F_0 = 30$  min (Prozeßtemperatur 140 °C, 23 sec äquivalente Heißhaltezeit) wird dieser Wert nicht unterschritten.

### 3.4 Betrachtung der reaktionskinetischen Parameter für die Denaturierung von $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin im UHT-Bereich

Die Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Neben pH-Wert, Lactose-Konzentration, Proteingehalt, Ionenzusammensetzung und Ionenstärke konnte gezeigt werden, daß das Casein/Molkenprotein-Verhältnis die Reaktionsordnung der  $\beta$ -Lactoglobulin-Denaturierung beeinflusst (4,16-21).

Die Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im UHT-Bereich läßt sich durch eine Reaktion 1,5. Ordnung beschreiben (Gleichung 1 gemäß (4)).

$$(C_a/C_{a0})^{-0.5} = 1 + 0,5 k_n (C_{a0})^{0.5} t \quad (1)$$

$C_a$  = Konzentration an nativem Molkenprotein zu den entsprechenden Heißhaltezeiten

$C_{a0}$  = Ausgangskonzentration der Molkenprotein in Rohmilch bzw. Ausgangsmilch

$k_n$  = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (1,5. Ordnung)

$t$  = äquivalente Heißhaltezeit

Bei Auftragung von  $(C_a/C_{a0})^{-0.5}$  gegen die äquivalente Heißhaltezeit wird ein linearer Zusammenhang erhalten. Wie für die Hitzeindikatoren Furosin und Lactulose wird auch für  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin eine deutliche Abweichung der Regressionsgeraden vom Nullpunkt beobachtet (Abb. 6). Unter Vernachlässigung dieser Abweichung lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten für die Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin (A+B) und für die einzelnen genetischen Varianten A und B bestimmen. In Anlehnung an den Dezimalreduktionswert D einer Reaktion 1. Ordnung läßt sich ein Dezimalreduktionswert  $D^*$  für eine Reaktion beliebiger Ordnung nach der vereinfachten Gleichung  $D^* = D/F = 1/k$  bestimmen ( $k$  = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion,  $F$  = konstanter nur von der Ausgangskonzentration abhängiger Faktor). Die Ergebnisse für die einzelnen Molkenproteine sind in Tabelle 4 aufgelistet.

### 3.5 Analyse der säurelöslichen $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalte in den HE-Milchproben

In der für die Hoherhitzung an den fünf Versuchstagen eingesetzte Ausgangsmilch wurden unterschiedliche Ausgangsgehalte an nicht denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin gemessen, die auf unterschiedliche Wärmebelastung

während der Homogenisierung oder auf natürliche Schwankungen in der jeweiligen Rohmilch zurückzuführen sein können (Tabelle 5). Wie Abbildung 7 verdeutlicht, liegen in der Ausgangsmilch auch unterschiedliche Verhältnisse der genetischen Varianten A und B des  $\beta$ -Lactoglobulins vor. Da die Casein/Molkenprotein-Verhältnisse in der Milch die Reaktionskinetik der Denaturierung von  $\beta$ -Lactoglobulin beeinflusst, sind mit größeren Schwankungen in den ermittelten  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalten zu rechnen. Die Ergebnisse des 5. Versuchstages mit den längsten Heißhaltezeiten HE 1.5 -HE 5.5 wurden bei der Auswertung nicht einbezogen, da eine korrekte Bestimmung der jeweiligen äquivalenten Heißhaltezeiten nicht möglich war.

Unter den Temperatur/Zeit-Bedingungen der Hoherhitzung in einem Temperaturbereich von 86 °C bis 125 °C weist  $\alpha$ -Lactalbumin wie im UHT-Bereich die größte Hitzestabilität auf. Bei der Prozeßtemperatur von 86 °C ist kein signifikanter Abfall an  $\alpha$ -Lactalbumin festzustellen (Abb. 8). Ab 95 °C ist eine eindeutige Denaturierung erst bei der längsten Heißhaltezeit von 45 sec festzustellen.

Beide genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulins weisen eine deutlich geringere Hitzestabilität im Temperaturbereich von 86 °C bis 125 °C auf (Abb. 9-11). Ab 105 °C und Heißhaltezeiten von 45 sec liegt  $\beta$ -Lactoglobulin weitgehend denaturiert vor.

Zur Unterscheidung von pasteurisierter und hoherhitzter Milch wird in der EU ein  $\beta$ -Lactoglobulin-Grenzwert in Abhängigkeit vom Gesamtprotein diskutiert. Durch Bezug des  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes auf den Proteingehalt der Milch sollen die natürlichen Schwankungen des Proteingehaltes berücksichtigt werden. Pasteurisierte Milch sollte einen nativen  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalt von mindestens 10 % in Bezug auf den Proteingehalt aufweisen. Nach dieser Klassifizierung könnte lediglich die Milchprobe HE 1.1 mit der geringsten Wärmebehandlung als pasteurisierte Milch eingestuft werden (Tab. 5).

### 3.6 Betrachtung der reaktionskinetischen Parameter für die Denaturierung von $\alpha$ -Lactalbumin- und $\beta$ -Lactoglobulin im HE-Bereich

Die Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im UHT-Bereich läßt sich durch eine Reaktion 1,5. Ordnung beschreiben (Gleichung 1).

$$(C_a/C_{a0})^{-0,5} = 1 + 0,5 k_n (C_{a0})^{0,5} t \quad (1)$$

$C_a$  = Konzentration an nativem Molkenprotein zu den entsprechenden Heißhaltezeiten

$C_{a0}$  = Ausgangskonzentration der Molkenprotein in Rohmilch bzw. Ausgangsmilch

$k_n$  = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

$t$  = äquivalente Heißhaltezeit

Bei Auftragung von  $(c_a/c_{a0})^{-0,5}$  gegen die äquivalente Heißhaltezeit wird ein linearer Zusammenhang erhalten (Abb. 12-15). Aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden können die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Denatu-



rierung der einzelnen Molkenproteine unter Berücksichtigung der mittleren Ausgangskonzentration  $C_{a0}$  ermittelt werden (Tab. 6). Die lineare Regressionsgerade der höchsten Prozeßtemperatur von 125 °C weist, wie für die Hitzeindikatoren Furrosin und Lactulose beobachtet, eine zu geringe Steigung aus und wurde in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von der Temperatur erlaubt eine Bestimmung der Aktivierungsenergie  $E_A$  nach der Arrheniusgleichung. Durch Auftragung von  $\ln k$  gegen die reziproke absolute Temperatur ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden die Aktivierungsenergie.  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin weisen aufgrund ihres komplexen Denaturierungsverhalten einen jeweils atypischen Verlauf der Regressionsgeraden im Arrheniusplot auf und bekräftigen damit Ergebnisse aus dem Arbeitskreis von Kessler (4). Es werden im unteren Temperaturbereich deutlich höhere Steigungen und somit höhere Aktivierungsenergien als im oberen Temperaturbereich beobachtet. Dieser Knick in der Regressionsgeraden läßt darauf schließen, daß im unteren Bereich die Entfaltung des Proteins gegenüber der Aggregationsreaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, wohingegen im oberen Temperaturbereich die Aggregationsreaktionen geschwindigkeitsbestimmend sind. Nach Kessler (4) liegt der Knickpunkt des Arrheniusplots für  $\alpha$ -Lactalbumin bei 80 °C und für beide genetischen Varianten des  $\beta$ -Lactoglobulin bei 90 °C. Nach Luf (10) wird dieser Knickpunkt für  $\beta$ -Lactoglobulin aber schon bei 85 °C beobachtet.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem UHT-Bereich bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C wird im Arrheniusplot für  $\alpha$ -Lactalbumin ein linearer Zusammenhang von 86 °C bis 140 °C ermittelt (Abb. 16). Aus der Steigung der Regressionsgerade ergibt sich eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 70,4 kJ/mol (Tab. 7). Dieser Befund entspricht dem von Kessler (4) für diesen Temperaturbereich nach einer Reaktionskinetik 1. Ordnung ermittelten Wert für die Aktivierungsenergie von  $\alpha$ -Lactalbumin  $E_A = 69$  kJ/mol.

Der Arrheniusplot für  $\beta$ -Lactoglobulin A+B (wie auch die einzelnen genetischen Varianten A und B) weist bei Berücksichtigung des Ergebnisses aus dem UHT-Bereich schon bei 95 °C einen deutlichen Knick in der Regressionsgerade auf (Abb. 17-19). Bei Beschränkung auf den Temperaturbereich von 105 - 140 °C wird eine Aktivierungsenergie für  $\beta$ -Lactoglobulin A von 53,1 kJ/mol und für  $\beta$ -Lactoglobulin B von 23,5 kJ/mol bestimmt. Die für die  $\beta$ -Lactoglobulin A+B ermittelte Aktivierungsenergie liegt erwartungsgemäß zwischen den Einzelergebnissen bei 39,1 kJ/mol (Tab. 7). Kessler (4) hat für  $\beta$ -Lactoglobulin A im Temperaturbereich von 95 °C - 150 °C ebenfalls eine vergleichbare Aktivierungsenergie  $E_A$  von 54,1 kJ/mol gefunden. Lediglich für die Denaturierung von  $\beta$ -Lactoglobulin B wurde in der vorliegenden Arbeit eine deutlich geringere Aktivierungsenergie ( $E_A = 23,5$  kJ/mol gegenüber 47,8 kJ/mol nach (4)) und somit eine deutlich geringere Hitzestabilität für die genetische Variante B festgestellt. In der Literatur wird die Hitzestabilität von  $\beta$ -Lactoglobulin widersprüchlich diskutiert. Möglicherweise kann aufgrund der komplizierten Reaktionsmechanismen bei der Denaturierung und Aggregation von  $\beta$ -Lactoglobulin keine einheitliche Aktivierungsenergie über größere Temperaturbereiche beobachtet werden.

In Anlehnung an den Dezimalreduktionswert  $D$  einer Reaktion 1. Ordnung läßt sich auch im HE-Bereich aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ein Dezimalreduktionswert  $D^*$  für eine Reaktion beliebiger Ordnung nach der vereinfachten Gleichung  $D^* = D/F = 1/k$  bestimmen ( $k$  = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion,  $F$  = konstanter nur von der Ausgangskonzentration abhängiger Faktor). Aus der Temperaturabhängigkeit des Dezimalreduktionswertes läßt sich der  $z$ -Wert für die Denaturierung der jeweiligen Molkenproteine ermitteln. Die Bestimmung des  $z$ -Wertes erfolgte gemäß (23) durch Auftragen von  $\log D$  über die entsprechende Prozeßtemperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ). Der  $Q_{10}$ -Wert ergibt sich nach Gleichung  $\log Q_{10} = 10/z$ .

Auch bei der Auftragung von  $\log D$  gegen die Prozeßtemperatur wird für  $\beta$ -Lactoglobulin ein atypischer Knickpunkt (bei  $95^{\circ}\text{C}$ ) im untersuchten Temperaturbereich beobachtet. Die Bestimmung des  $z$ -Wertes erfolgte für  $\alpha$ -Lactalbumin im Temperaturbereich von  $86^{\circ}\text{C}$  -  $140^{\circ}\text{C}$  und für  $\beta$ -Lactoglobulin im Temperaturbereich von  $105^{\circ}\text{C}$  -  $140^{\circ}\text{C}$ . Es wurden ungewöhnlich hohe  $z$ -Werte zwischen  $40,3^{\circ}\text{C}$  und  $127,1^{\circ}\text{C}$  für die Denaturierung der Molkenproteine erhalten (Tab. 7). Entsprechend große Unterschiede wurden auch in der Literatur berichtet (4,6,16,24).

### 3.7 Analyse der säurelöslichen $\alpha$ -Lactalbumin und $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalte in den PT-Milchproben

Unter den Temperatur/Zeit-Bedingungen der Thermisierung und Pasteurisierung werden nur geringe Änderungen im säurelöslichen Gehalt an  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin beobachtet (Tab. 8). Bei einer Prozeßtemperatur von  $62^{\circ}\text{C}$  wird selbst bei einer Langzeitpasteurisierung von 30 min (1800 sec) kein signifikanter Abfall im säurelöslichen Gehalt von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin beobachtet. Der für die Prozeßtemperaturen von  $72^{\circ}\text{C}$  und  $75^{\circ}\text{C}$  und Heißhaltezeiten von 76 sec beobachtete geringe Abfall des säurelöslichen  $\alpha$ -Lactalbumin-Gehaltes liegt nur gering über dem Bereich der Wiederholbarkeit der Analysenmethode ( $r = 5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ). Für  $\beta$ -Lactoglobulin kann dagegen ein signifikanter Abfall des säurelöslichen Gehaltes um 12 - 15 % (Prozeßtemperatur  $75^{\circ}\text{C}$ , Heißhaltezeit 76 sec) beobachtet werden. Auch im Temperaturbereich von  $62$  -  $75^{\circ}\text{C}$  weist  $\beta$ -Lactoglobulin eine geringere Hitzestabilität als  $\alpha$ -Lactalbumin auf. Die geringere Abnahme der genetischen Variante A des  $\beta$ -Lactoglobulins läßt eine größere Hitzestabilität gegenüber  $\beta$ -Lactoglobulin B auch in dem Temperaturbereich von  $62^{\circ}\text{C}$  -  $75^{\circ}\text{C}$  vermuten.

Durch Bezug des säurelöslichen  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes auf den Gesamtproteingehalt läßt sich ein prozentualer  $\beta$ -Lactoglobulin-Wert erhalten, der von dem Proteingehalt der Milch unabhängig ist und nur von den natürlichen Casein/Molkenprotein-Schwankungen und der Hitzebehandlung abhängig ist. In der EU-Expertenkommission wird ein Grenzwert für pasteurisierte Milch gegenüber hocherhitzter Milch von 10 %  $\beta$ -Lactoglobulin/Gesamtprotein diskutiert. In keinem der hier unter definierten Prozeßbedingungen hergestellten Milchen wurde dieser Grenzwert unterschritten. Der Einfluß unterschiedlicher Proteinverhältnisse in der Ausgangsmilch ist jedoch noch ungeklärt. Insbesondere extreme Schwankungen des Gesamtproteingehaltes und die natürliche Schwankungsbreite des

Casein/Molkenprotein-Verhältnisses könnten den diskutierten prozentualen Gehalt an  $\beta$ -Lactoglobulin beeinflussen.

#### 4. Zusammenfassung und Schlußbetrachtung

Die Hitzeempfindlichkeit der einzelnen Molkenproteine ermöglicht eine Charakterisierung der Wärmebehandlung von Milch auf der Basis der Molkenproteindenaturierung. Der säurelösliche Gehalt von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin wurde in unter definierten Prozeßbedingungen hergestellten Milchproben analysiert, wobei der gesamten Temperatur/Zeit-Bereich der Thermisierung, Pasteurisierung (Kurz- und Langzeiterhitzung), Hoherhitzung, UltraHoherhitzung und Sterilisierung erfaßt wurden. Die Bestimmung des säurelöslichen Gehaltes von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin in den wärmebehandelten Milchen erfolgte mittels einer von Resmini (7-8) entwickelten Reversed-Phase-HPLC-Methode.

In den in Flaschen sterilisierten Milchproben lag selbst bei geringer Wärmebelastung (Sterilisationswerte  $F_0$  um 0,5 min) eine fast vollständige Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin vor. Für den Bereich der UltraHoherhitzung (Prozeßtemperatur 140 °C) und Hoherhitzung (Prozeßtemperatur 86 °C - 125 °C) erweisen sich die säurelöslichen Gehalte an  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin als geeignete Hitzeindikatoren für die Wärmebelastung.  $\alpha$ -Lactalbumin und die genetischen Varianten A und B des  $\beta$ -Lactoglobulins weisen unterschiedliche Hitzestabilitäten auf ( $\alpha$ -Lactalbumin >  $\beta$ -Lactoglobulin A >  $\beta$ -Lactoglobulin B).  $\beta$ -Lactoglobulin ist als Hitzeindikator gegenüber  $\alpha$ -Lactalbumin aufgrund seiner größeren Hitzeempfindlichkeit und seiner besseren analytischen Quantifizierbarkeit zu bevorzugen. Im Bereich der UltraHoherhitzung (Prozeßtemperatur 140 °C, äquivalente Heißhaltezeiten von 4 - 23 sec) konnte selbst bei Sterilisationswerten  $F_0$  von 30 min noch natives  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin bestimmt werden. Obwohl durch die Homogenisierung in der Ausgangsmilch deutlich höhere Vorschädigungen der Molkenproteine gegenüber der Rohmilch zu beobachten sind (Abb. 4), liegen nach der UHT-Erhitzung unter den gewählten Versuchsbedingungen vergleichbar große Gehalte an nativen Molkenproteinen in beiden Versuchsmilchen vor.

Die Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin läßt sich im gesamten Temperaturbereich von 86 - 140 °C mit einer Reaktionskinetik 1,5. Ordnung beschreiben. Für  $\alpha$ -Lactalbumin wird im untersuchten Temperaturbereich ein linearer Zusammenhang im Arrheniusplot ( $\ln k_n$  gegen die absolute reziproke Temperatur aufgetragen,  $k_n$  = Reaktionsgleichgewichtskonstante nach einer Reaktion 1,5. Ordnung) beobachtet und eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 70,4 kJ/mol ermittelt. Im Arrheniusplot für das  $\beta$ -Lactoglobulin wird für beide genetischen Varianten ein atypischer Knickpunkt im Bereich von 95 °C beobachtet. Dies läßt sich durch eine geänderte Reaktionskinetik erklären. Im komplexen Reaktionsverlauf der Molkenproteindenaturierung kommt es nach einer Auffaltung der globulären Proteine zu einer Reihe von Aggregationsreaktionen untereinander oder mit anderen Milchproteinen (hauptsächlich  $\kappa$ -Casein). Unterhalb 95 °C sind offensichtlich die Auffaltungsreaktionen geschwindigkeitsbestimmend, wohingegen oberhalb von 95 °C die Aggregationsreaktionen entscheidend sind. Im Temperaturbereich von

105 °C - 140 °C wird für  $\beta$ -Lactoglobulin A eine Aktivierungsenergie  $E_A$  von 53,1 kJ/mol und für  $\beta$ -Lactoglobulin B eine Aktivierungsenergie von 23,5 kJ/mol bestimmt. Für die Denaturierung der Molkenproteine wurden z-Werte von 40,3 °C ( $\alpha$ -Lactalbumin), 56,2 °C ( $\beta$ -Lactoglobulin A) und 127,1 °C ( $\beta$ -Lactoglobulin B) bestimmt.

Im Thermisierungs- und Pasteurisierungsbereich ist der säurelösliche Gehalt von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin nur bedingt zur Charakterisierung der Wärmebelastung geeignet. Erst ab Prozeßtemperaturen über 62 °C kann eine geringe Abnahme des säurelöslichen Gehaltes insbesondere des hitzeempfindlicheren  $\beta$ -Lactoglobulins beobachtet werden. Ohne Kenntnis der Ausgangskonzentration ist hier ein Erhitzungsnachweis jedoch schwierig.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin als Hitzeindikatoren für den Hoherhitzungs- und Ultrahoherhitzungsbereich (Sterilisationswerte  $F_0$  bis 30 min im HE- und UHT-Bereich)) geeignet sind. Durch die asymptotische Annäherung der Denaturierung an 100 %- beziehungsweise an die 0 %-Linie ist eine Quantifizierung der Wärmebelastung im Pasteurierungs- und Sterilisierungsbereiches schwierig. Bei hoher Wärmebelastung im Bereich der Sterilisierung müssen chemische Hitzeindikatoren wie Lactulose oder N6-Methyladenosin mit in Betracht gezogen werden. Bei geringer Wärmebelastung ermöglichen besonders hitzeempfindliche Molkenproteine wie die Immunglobuline oder bovines Serumalbumin eine bessere Quantifizierung des Wärmeeintrages.

## 5. Literatur

- (1) Elfagm, A. A. u. Wheelock J. V. : J. Dairy Sci. **61**, 159 (1978)
- (2) Morr, C. V.: J. Dairy Sci. **58**, 977 (1975)
- (3) Smits, P. u. Van Brouwershaven, J. H.: J Dairy Res. **47**, 313 (1980)
- (4) Kessler H. G. u. Beyer H. J.: Int. J. Biol. Macromol. **13**, 165-173 (1991)
- (5) Dalgleish, D. G. u. Banks, J. M.: Milchwissenschaft **46**, 75-78 (1991)
- (6) Hillier, R. M., Lyster, R. L. J. u. Cheeseman, G. C.: Dairy Res. **46**, 103 (1979)
- (7) Resmini, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J. A. u. Andreini, R.: Ital. J. Food Sci. **3**, 51-62 (1989)
- (8) Resmini, P., Pellegrino, L., Andreini, R. u. Prati, F.: Sci. Tecn. Latt.-Cas. **40**, 7-23 (1989)
- (9) Duranti, M., Carrpen, A. Lametti, S. u. Pagini, S.: Milchwissenschaft **46**, 230-232 (1991)
- (10) Luf, W.: Österr. Milchwissenschaft **43**, 2; Scientific Supplement **2**, 7-12 (1988)
- (11) Luf, W., Feiersinger, G. u. Brandl, E.: Proc. Eur. Food Chem. VI, **2**, 669-674 (1991)
- (12) Parris, N. u. Baginski, M. A.: J. Dairy Sci. **74**, 58-64 (1991)
- (13) R. Andreini, J. Chiodi, I. De Noni, P. Resmini, G. Batelli, L. Cecchi, R. Todesco, T. M. P. Cattaneo, M. Rampilli u. R. Foschino: Italy. Sci. Tecn. Latt.-Cas. **41**, 472-492 (1990)

- (14) R. Lopez-Fandino, N. Corzo, M. Villamiel, T. Delgado, A. Olano u. M. Ramos: *J. Food Prot.* **56**, 263-264, 269 (1993)
- (15) Schlimme E., Buchheim W. u. Heeschen W.: *dmz* **2**, 64-69 (1994)
- (16a) Dannenberg, F.: Dissertation, TU München (1986)
- (16b) Dannenberg, F. u. Kessler, H. G.: *Milchwissenschaft* **43**, 3 (1988)
- (17) Lyster, R. L. J.: *J. Dairy Res.* **37**, 233 (1970)
- (18) De Wit, J. N. u. Klarenberg, G.: *J. Dairy Sci.* **67**, 2701 (1984)
- (19) Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y. u. Irvine, D.: *J. Dairy Sci.* **71**, 1472-1483 (1988)
- (20) Paulsson, M. u. Dejmek, P.: *J. Dairy Sci.* **73**, 590-600 (1990)
- (21) Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottingham, S.M., Kitchen, B.J. u. Masters, C.J., *J. Dairy Res.* **59**, 187-195 (1992)
- (22) van Boekel, M. A. J. S. u. Ribadeau-Dumas, B.: *Neth. Dairy J.* **41**, 281-284 (1987)
- (23) Wallhäusser, K. H.: *Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)
- (24) Burton, H. *Ultrahigh-temperature processing of milk and milk products*, Elsevier Appl. Sci., London und New York (1988)

**Tabelle 1**

**Gehalte an nicht denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im Sterilbereich**

Probe	Prozeß- temperatur 9 (°C)	äquivalente Heißhaltezeit	$\alpha$ -LA (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A+B (mg/100 ml)	F <sub>0</sub> -Wert
AM 6.6			93,9	380,1	
AM 23.6			110,7	386,1	
AM 30.6			114,0	384,8	
AM 7.7			103,0	355,6	
AM 12.7			104,8	344,6	
ST 1.1	110	13,8	16,8	1,7	0,28
ST 1.2	"	440,4	1,1	n.b.	0,57
ST 1.3	"	1224	n.b.	n.b.	1,26
ST 1.4	"	2610	n.b.	n.b.	2,68
ST 2.1	114	199,8	7,7	1,2	0,65
ST 2.2	"	594	n.b.	n.b.	1,93
ST 2.3	"	1209	"	"	4,00
ST 2.4	"	2520	"	"	8,20
ST 3.1	119	194,4	"	"	2,00
ST 3.2	"	609,6	"	"	6,27
ST 3.3	"	1416	"	"	11,81
ST 3.4	"	2430	"	"	20,30
ST 4.1	125	150	"	"	6,14
ST 4.2	"	571,8	"	"	23,40
ST 4.3	"	1314	"	"	42,70
ST 4.4	"	2040	"	"	84
ST 5.1	129	138	"	"	14,3
ST 5.2	"	678	"	"	71,0
ST 5.3	"	1392	"	"	143,0
ST 5.4	"	2622	"	"	269,5
ST 6.1	134	156	"	"	51,2
ST 6.2	"	780	"	"	255
ST 6.3	"	1122	"	"	364
ST 6.4	"	2970	"	"	966

n.b. = unterhalb der Nachweisgrenze von 1 mg / 100 ml

**Tabelle 2****Prozentualer Gehalt von  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehaltes  
in der Ausgangsmilch**

	$\alpha$ -LA [%]	$\beta$ -LG B [%]	$\beta$ -LG A [%]	$\beta$ -LG A+B [%]
Rohmilch	100	100	100	100
homogenisierte Ausgangsmilch	71,6	79,1	72,1	75,5

**Tabelle 3****Gehalt an nicht denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin im UHT-Bereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltezeit $\tau$ (s)	$\alpha$ -LA (mg/100 ml)	$\beta$ -LG B (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A+B (mg/100 ml)	F <sub>0</sub> -Wert
RM 31.05.1995	-	-	138,5	205,0	271,4	491,4	-
RUT 1.1	140	4	47,1	13,6	19,3	32,2	5,0
RUT 1.2	"	8	43,9	10,5	14,0	24,0	10,0
RUT 1.3	"	12	36,1	7,3	8,7	15,7	15,5
RUT 1.4	"	23	23,0	5,5	4,6	10,0	30,0
AM 31.05.1995	-	-	99,2	162,2	195,7	371,0	-
UT 1.1	140	4	46,8	13,5	17,9	30,8	5,0
UT 1.2	"	8	38,3	10,9	12,7	23,2	10,0
UT 1.3	"	12	33,4	8,0	7,7	15,5	15,5
UT 1.4	"	23	22,2	5,4	3,9	9,3	30,0



**Tabelle 4****Abschätzung der reaktionskinetischen Daten für die Molkenprotein-denaturierung im UHT-Bereich**

	Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	$r^{(1)}$	$k_n^{(2)}$	$\ln k_n$	$\log D^{*(3)}$
$\alpha$ -LA	RUT 1.1 - 1.4	140	0,991	$6,85 \cdot 10^{-3}$	-4,98	2,164
	UT 1.1 - 1.4	„	0,999	$6,90 \cdot 10^{-3}$	-4,98	2,161
$\beta$ -LG A	RUT 1.1 - 1.4	„	0,997	$2,55 \cdot 10^{-2}$	-3,67	1,599
	UT 1.1 - 1.4	„	0,997	$2,89 \cdot 10^{-2}$	-3,54	1,539
$\beta$ -LG B	RUT 1.1 - 1.4	„	0,972	$1,63 \cdot 10^{-2}$	-4,12	1,788
	UT 1.1 - 1.4	„	0,993	$1,68 \cdot 10^{-2}$	-4,09	1,775
$\beta$ -LG A+B	RUT 1.1 - 1.4	„	0,989	$1,48 \cdot 10^{-2}$	-4,21	1,830
	UT 1.1 - 1.4	„	0,995	$1,57 \cdot 10^{-2}$	-4,15	1,804

(1) Korrelationskoeffizient der linearen Regression bei Zugrundelegung einer Reaktion 1,5ter Ordnung (Auftragung von  $(c_a/c_{a0})^{-0,5}$  über die äquivalente Heißhaltezeit  $\tau$  (s))

(2) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_n$   $[(\text{mg}/100 \text{ ml})^{-0,5} \cdot \text{s}^{-1}]$

(3) Dezimalreduktionswert  $D^*$  vereinfachend nach  $D^* = \frac{1}{k_n}$  berechnet

Tabelle 5

Gehalt an nicht denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalt im HE-Bereich

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltzeit $\tau$ (s)	$\alpha$ -LA (mg/100 ml)	$\beta$ -LG B (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A+B (mg/100 ml)	F <sub>0</sub> -Wert [min]	Protein [%]	$\beta$ -LG A+B/ Protein [%]
AM X.1			99,2	161,8	223,0	376,4		3,14	11,6
AM X.2			97,7	161,8	176,9	334,0		3,13	10,4
AM X.3			111,3	197,8	172,8	367,0		3,25	11,0
AM X.4			109,7	172,6	187,6	355,2		3,14	11,0
AM X.5			95,6	155,1	182,9	332,5		3,16	10,2
HE 1.1	86	5,8	100,2	137,4	194,9	325,8	$0,2 \cdot 10^{-4}$		10,1
HE 1.2	"	15,0	103,4	135,8	158,4	2,89,8	$0,6 \cdot 10^{-4}$		9,0
HE 1.3	"	25,8	99,7	109,3	114,0	220,3	$1,6 \cdot 10^{-4}$		6,6
HE 1.4	"	45,9	98,4	77,8	111,4	165,8	$2,6 \cdot 10^{-4}$		5,7
HE 1.5	"	48,6	65,1	45,4	116,6	116,6	$3,0 \cdot 10^{-4}$		3,6
HE 2.1	95	5,4	95,4	110,6	164,6	269,6	$0,2 \cdot 10^{-3}$		8,3
HE 2.2	"	14,8	97,5	83,9	115,1	195,6	$0,7 \cdot 10^{-3}$		6,1
HE 2.3	"	25,7	98,4	58,4	71,6	128,0	$1,3 \cdot 10^{-3}$		3,8
HE 2.4	"	45,6	88,2	29,0	52,9	80,2	$2,1 \cdot 10^{-3}$		2,5
HE 2.5	"	62,4	48,6	5,6	21,3	21,3	$2,6 \cdot 10^{-3}$		0,7
HE 3.1	105	5,3	90,4	66,3	107,7	170,1	$0,2 \cdot 10^{-2}$		5,3
HE 3.2	"	14,7	93,3	48,1	71,8	117,6	$0,6 \cdot 10^{-2}$		3,7
HE 3.3	"	25,5	89,6	29,1	36,6	64,6	$1,4 \cdot 10^{-2}$		1,9
HE 3.4	"	45,5	75,4	12,8	20,0	32,2	$1,9 \cdot 10^{-2}$		1,0
HE 3.5	"	84,0	10,1	1,6	3,7	3,7	$3,4 \cdot 10^{-2}$		0,1
HE 4.1	115	5,4	85,8	50,0	79,4	126,6	$0,2 \cdot 10^{-1}$		3,9
HE 4.2	"	14,8	80,6	28,7	41,0	68,4	$0,6 \cdot 10^{-1}$		2,1
HE 4.3	"	25,6	74,5	17,9	19,2	36,6	$1,4 \cdot 10^{-1}$		1,1
HE 4.4	"	45,0	61,1	9,2	10,0	19,0	$1,8 \cdot 10^{-1}$		0,6
HE 4.5	"	49,2	2,8	1,9	3,2	3,2	$2,0 \cdot 10^{-1}$		0,1
HE 5.1	125	6,5	83,6	45,2	72,3	114,9	0,3		3,6
HE 5.2	"	16,2	87,7	38,6	51,5	88,5	0,8		2,7
HE 5.3	"	26,9	86,0	30,7	32,3	62,2	1,3		1,9
HE 5.4	"	46,2	72,4	17,2	20,7	37,3	1,9		1,2
HE 5.5	"	51,0	2,4	1,5	2,9	2,9	2,0		0,1

Tabelle 6

## Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter im HE-Bereich

	Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	$r^{(1)}$	$k_n^{(2)}$	$\ln k_n$	$\log D^{*(3)}$
$\alpha$ -LA	HE 1.1 - 1.4	86	0,756	$3,13 \cdot 10^{-4}$	-8,07	3,504
	HE 2.1 - 2.4	95	0,938	$4,99 \cdot 10^{-4}$	-7,60	3,302
	HE 3.1 - 3.4	105	0,956	$8,61 \cdot 10^{-4}$	-7,06	2,065
	HE 4.1 - 4.4	115	0,989	$1,45 \cdot 10^{-3}$	-6,54	2,839
	HE 5.1 - 5.4	125	0,913	$8,02 \cdot 10^{-4}$	-7,13	3,096
$\beta$ -LG A	HE 1.1 - 1.4	86	0,951	$8,85 \cdot 10^{-4}$	-7,03	3,053
	HE 2.1 - 2.4	95	0,992	$2,79 \cdot 10^{-3}$	-5,88	2,554
	HE 3.1 - 3.4	105	0,991	$6,33 \cdot 10^{-3}$	-5,06	2,199
	HE 4.1 - 4.4	115	0,996	$10,47 \cdot 10^{-3}$	-4,56	1,980
	HE 5.1 - 5.4	125	0,970	$5,74 \cdot 10^{-3}$	-5,16	2,241
$\beta$ -LG B	HE 1.1 - 1.4	86	0,971	$1,673 \cdot 10^{-3}$	-6,39	2,777
	HE 2.1 - 2.4	95	0,997	$4,799 \cdot 10^{-3}$	-5,34	2,319
	HE 3.1 - 3.4	105	0,994	$8,655 \cdot 10^{-3}$	-4,75	2,063
	HE 4.1 - 4.4	115	0,987	$10,910 \cdot 10^{-3}$	-4,52	1,962
	HE 5.1 - 5.4	125	0,992	$5,100 \cdot 10^{-3}$	-5,28	2,292
$\beta$ -LG A+B	HE 1.1 - 1.4	86	0,959	$9,20 \cdot 10^{-4}$	-6,99	3,036
	HE 2.1 - 2.4	95	0,994	$2,58 \cdot 10^{-3}$	-5,96	2,588
	HE 3.1 - 3.4	105	0,993	$5,26 \cdot 10^{-3}$	-5,25	2,279
	HE 4.1 - 4.4	115	0,994	$7,70 \cdot 10^{-3}$	-4,87	2,114
	HE 5.1 - 5.4	125	0,990	$3,58 \cdot 10^{-3}$	-5,63	2,446

(1) Korrelationskoeffizient der linearen Regression bei Zugrundelegung einer Reaktion 1,5ter Ordnung (Auftragung von  $(c_a/c_{a0})^{-0,5}$  über die äquivalente Heißhaltezeit  $\tau$  (s))

(2) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k_n$   $[(\text{mg}/100 \text{ ml})^{-0,5} \cdot \text{s}^{-1}]$

(3) Dezimalreduktionswert  $D^*$  vereinfachend nach  $D^* = \frac{1}{k_n}$  berechnet

**Tabelle 7****Reaktionskinetische Werte für die Denaturierung von  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin in Milch**

	Reaktions- ordnung n	T (°C)	$E_A$ (kJ/mol)	lnA	$r^{(1)}$	z-Wert (°C)	$Q_{10}$ -Wert	$r^{(2)}$
$\alpha$ -LA	1,5	86 - 140	70,4	15,42	-0,996	40,3	1,77	-0,999
$\beta$ -LG A	1,5	105 - 140	53,1	11,86	-0,999	56,2	1,51	-0,998
$\beta$ -LG B	1,5	105 - 140	23,5	2,81	-0,998	127,1	1,20	-0,997
$\beta$ -LG A+B	1,5	105 - 140	39,1	7,21	-0,999	78,2	1,34	-0,997

(1) Korrelationskoeffizient für die lineare Regression (Auftragung  $\ln k$  gegen  $T^{-1}$  [ $K^{-1}$ ])

(2) Korrelationskoeffizient für die lineare Regression (Auftragung  $\log D^*$  gegen die Prozeßtemperatur [ $^{\circ}C$ ])

**Tabelle 8****Gehalt an nicht denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin- und  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalt im PT-Bereich**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	äquivalente Heißhaltzeit $\tau$ (s)	$\alpha$ -LA (mg/100 ml)	$\beta$ -LG B (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A+B (mg/100 ml)	$\beta$ -LG A+B/ Protein* [%]
RM	-		117,9	178,3	251,7	422,0	12,4
PT 1.1	62	20	114,4	171,7	144,6	408,2	12,0
PT 1.2	"	40	115,4	172,4	246,7	410,9	12,1
PT 1.3	"	76	113,1	168,6	239,7	400,2	11,8
PT 1.4	"	1800	112,4	172,3	236,1	399,6	11,8
PT 2.1	72	20	111,9	165,0	236,6	393,9	11,6
PT 2.2	"	40	109,9	161,2	230,8	384,4	11,3
PT 2.3	"	76	108,1	155,1	221,7	369,1	10,9
PT 3.1	75	20	116,3	165,1	238,0	395,3	11,6
PT 3.2	"	40	113,2	155,9	227,3	376,2	11,1
PT 3.3	"	76	111,7	151,1	220,5	364,3	10,7

\*  $\beta$ -LG A+B-Gehalt bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Milch (Proteingehalt: 3,40 %)

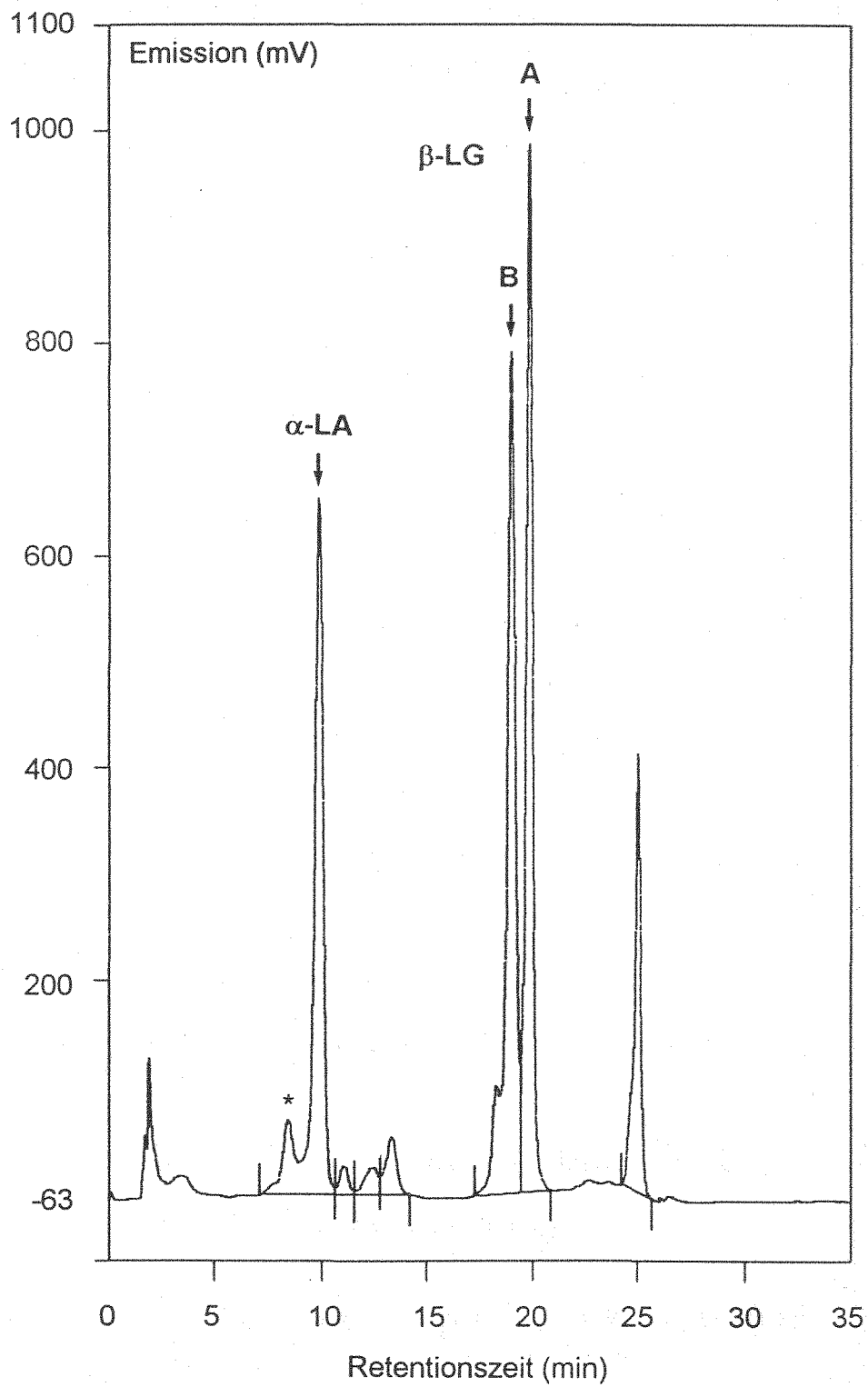


Abb. 1: Liquidchromatographische Trennung von säurelöslichen Molkenproteinen in einer gefriergetrockneten Rohmilch (Referenzstandard)

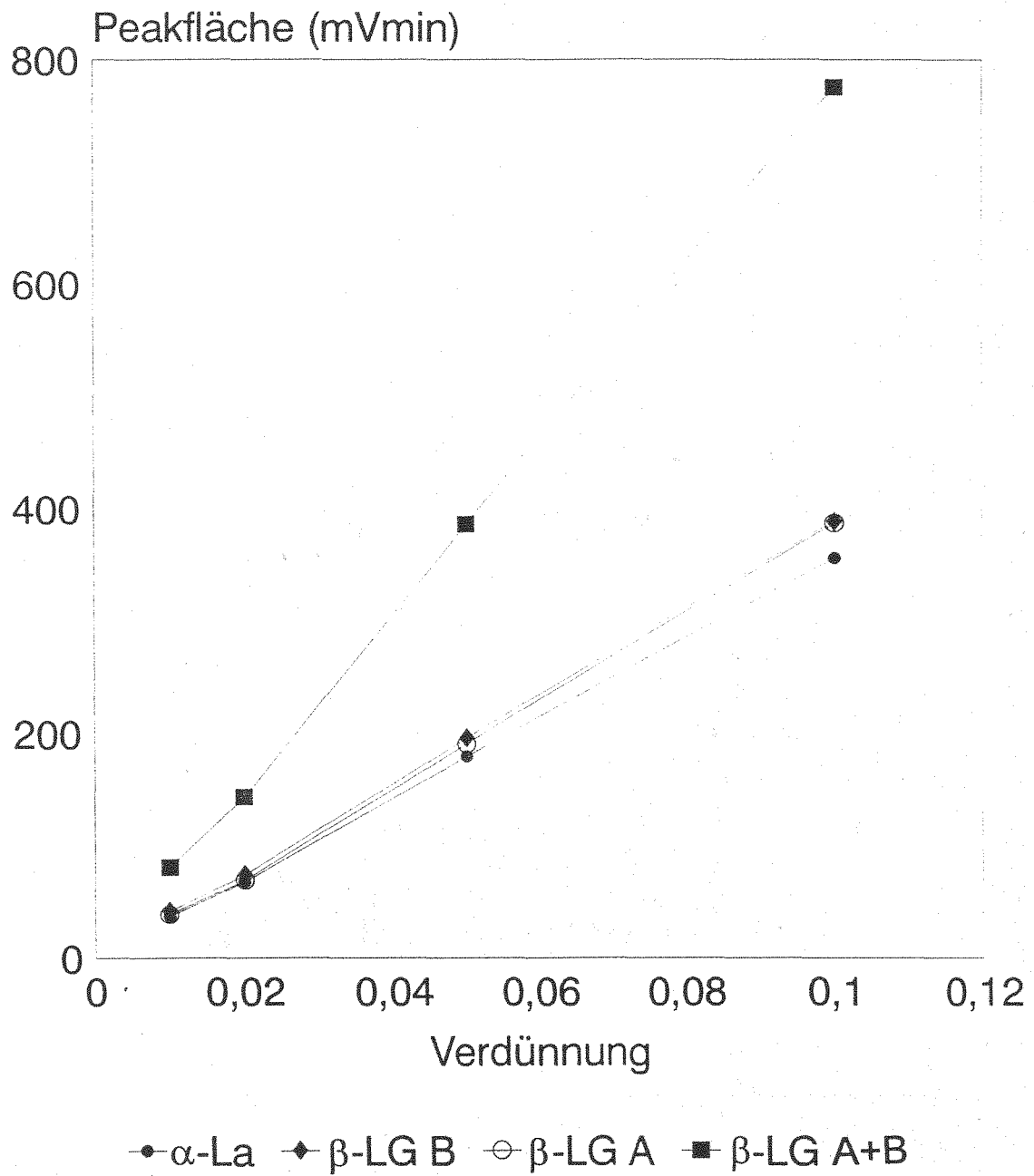


Abb. 2: Lineare Abhängigkeit der Peakfläche (mV · min) von der Probenverdünnung

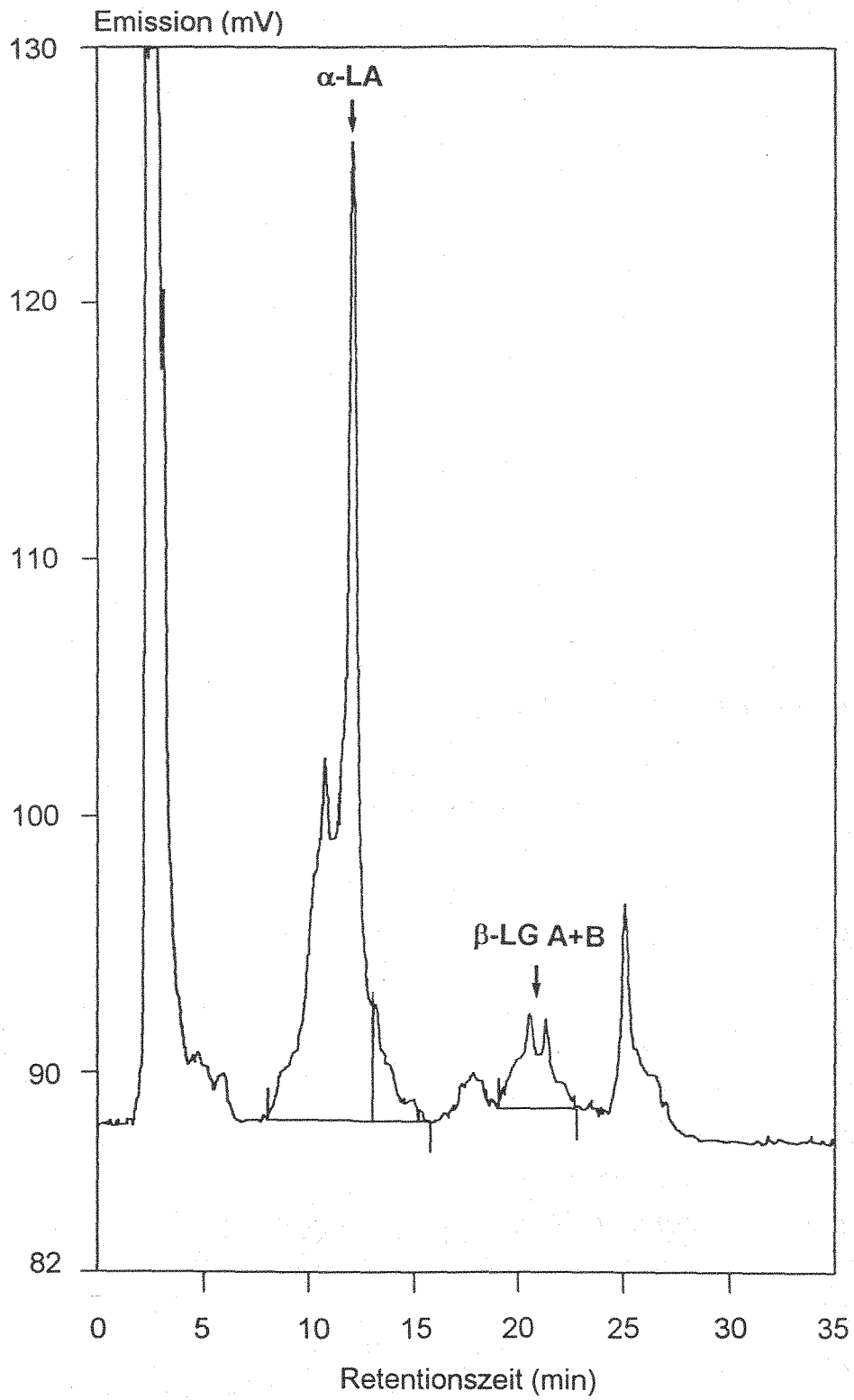


Abb. 3: Liquidchromatographische Trennung von säurelöslichen Molkenproteinen in einer Sterilmilch (ST 2.1)



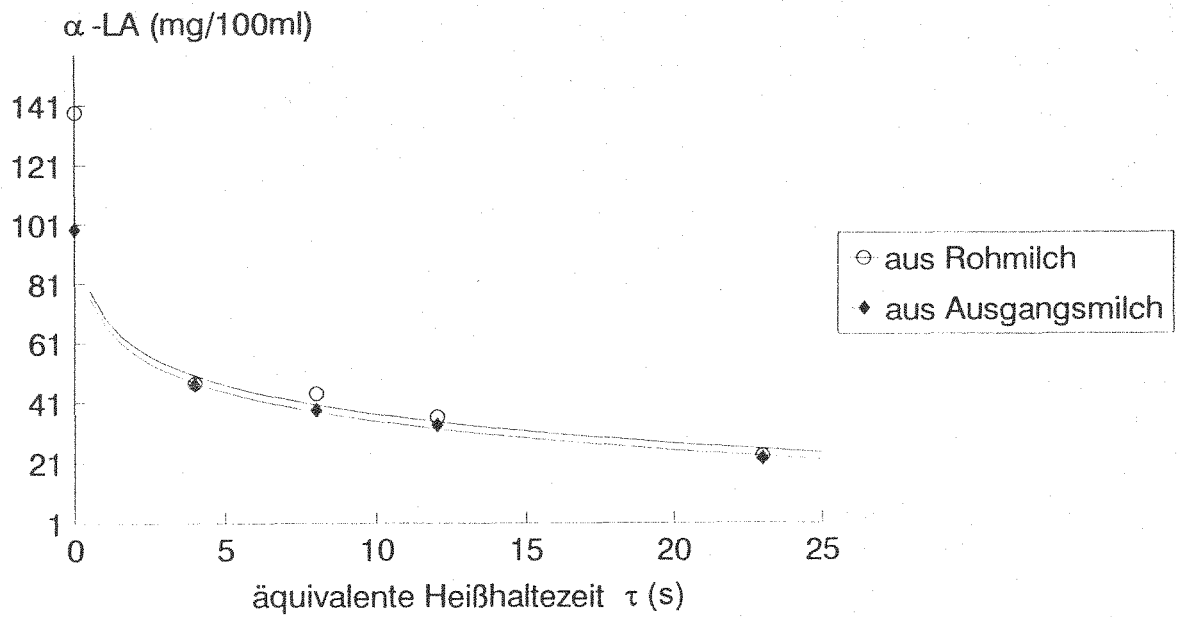


Abb. 4:  $\alpha$ -Lactalbumin-Gehalt in Milchproben des UHT-Bereiches bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

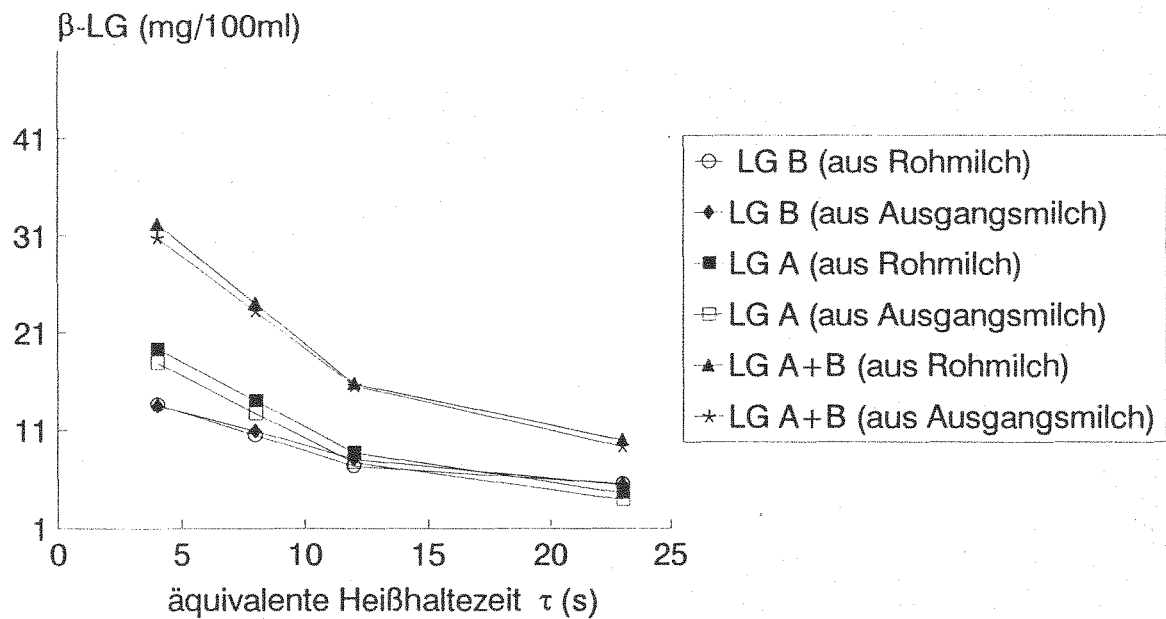


Abb. 5:  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalt in Milchproben des UHT-Bereiches bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

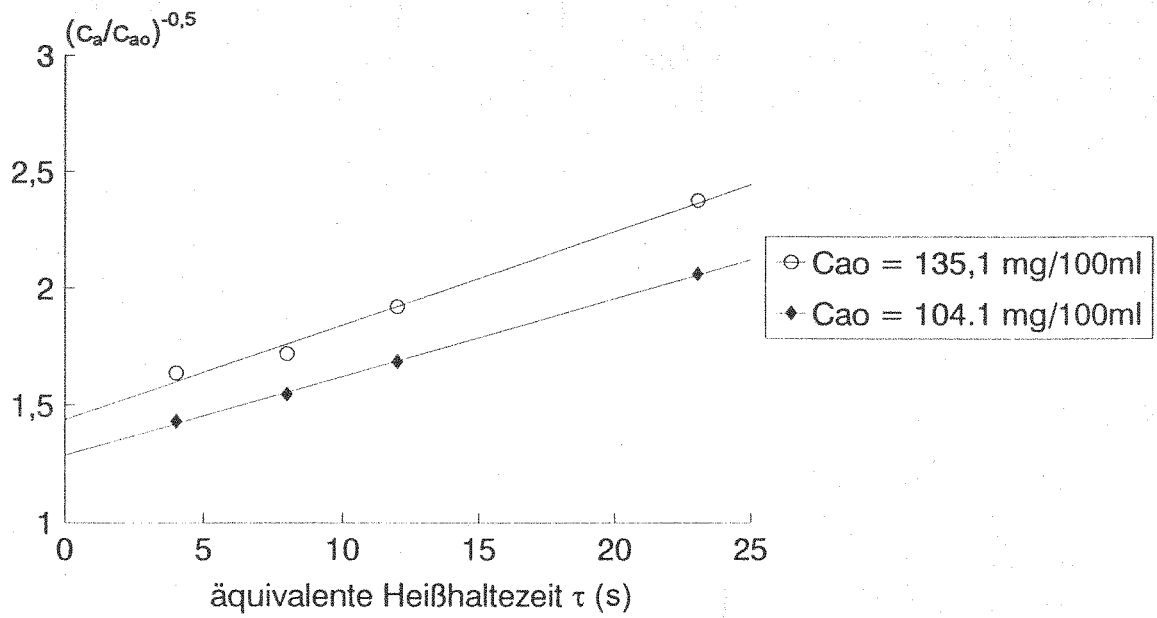


Abb. 6: Anteil an denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin in Milchproben des UHT-Bereiches bei einer Prozeßtemperatur von 140 °C unter Zugrundelegung einer Reaktionsordnung  $n = 1,5$

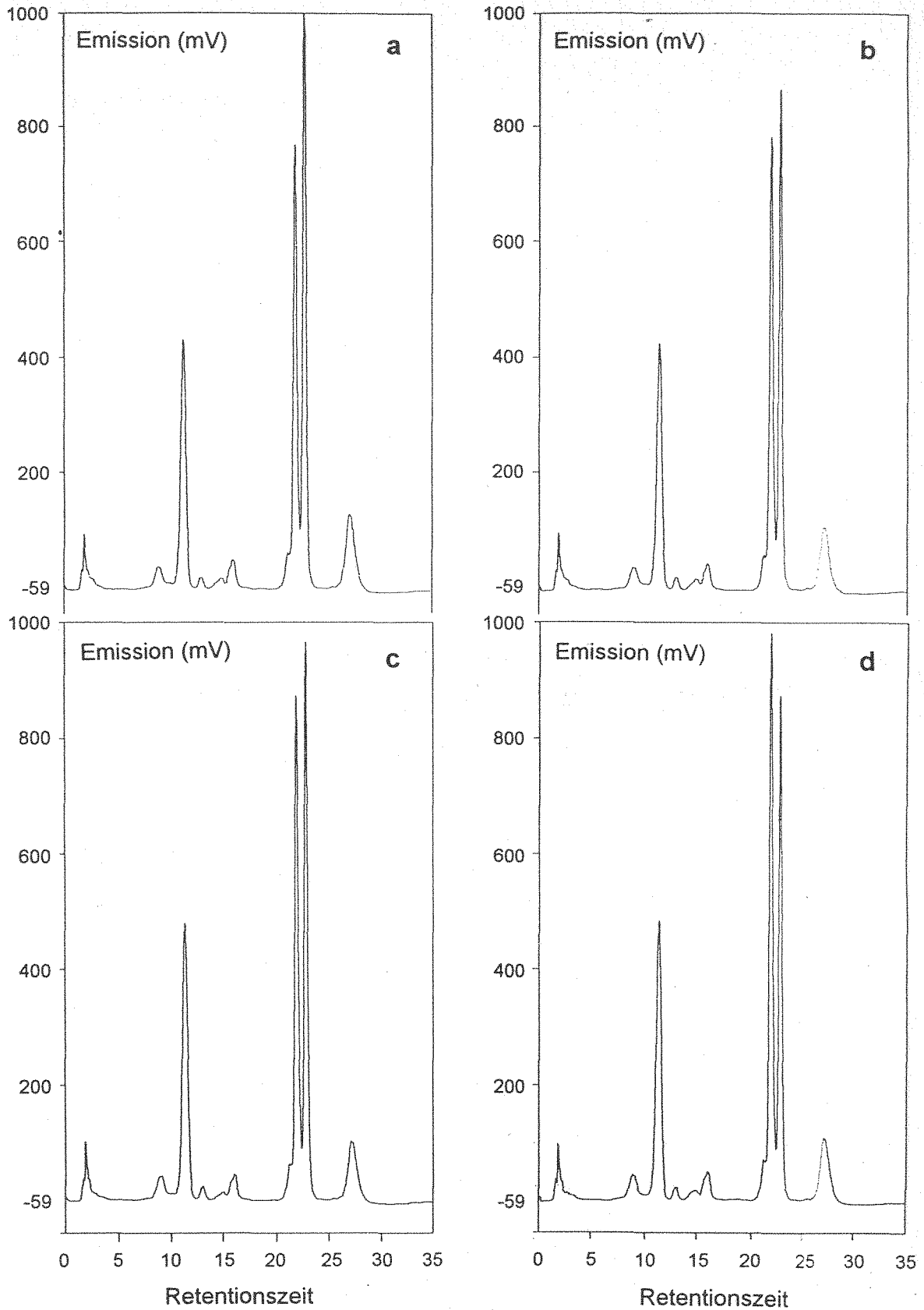


Abb. 7: Liquidchromatographische Trennung der säurelöslichen Molkenproteine in Ausgangsmilchen des HE-Bereiches  
a) AM X.1, b) AM X.2, c) AM X.3, d) AM X.4

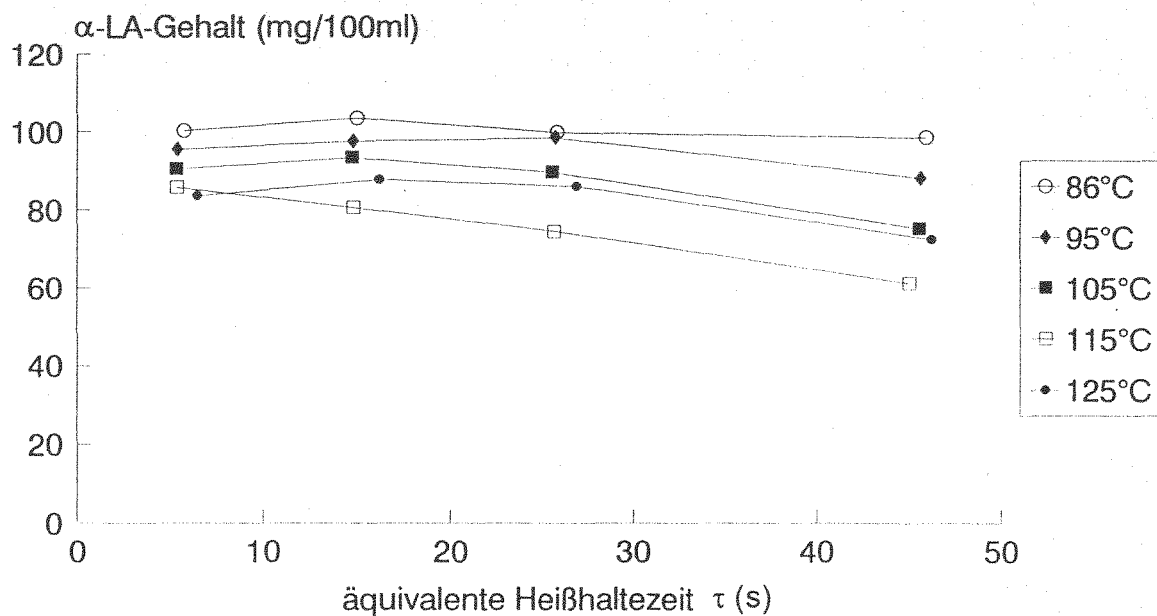


Abb. 8:  $\alpha$ -Lactalbumin-Gehalt in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

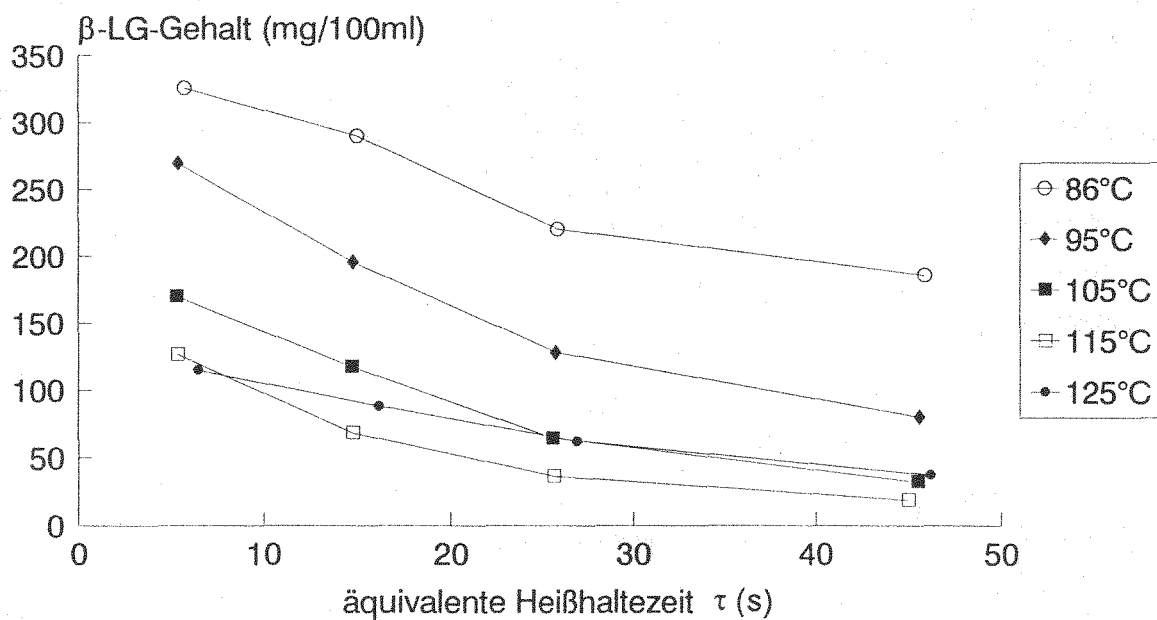


Abb. 9:  $\beta$ -Lactoglobulin-Gehalt in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

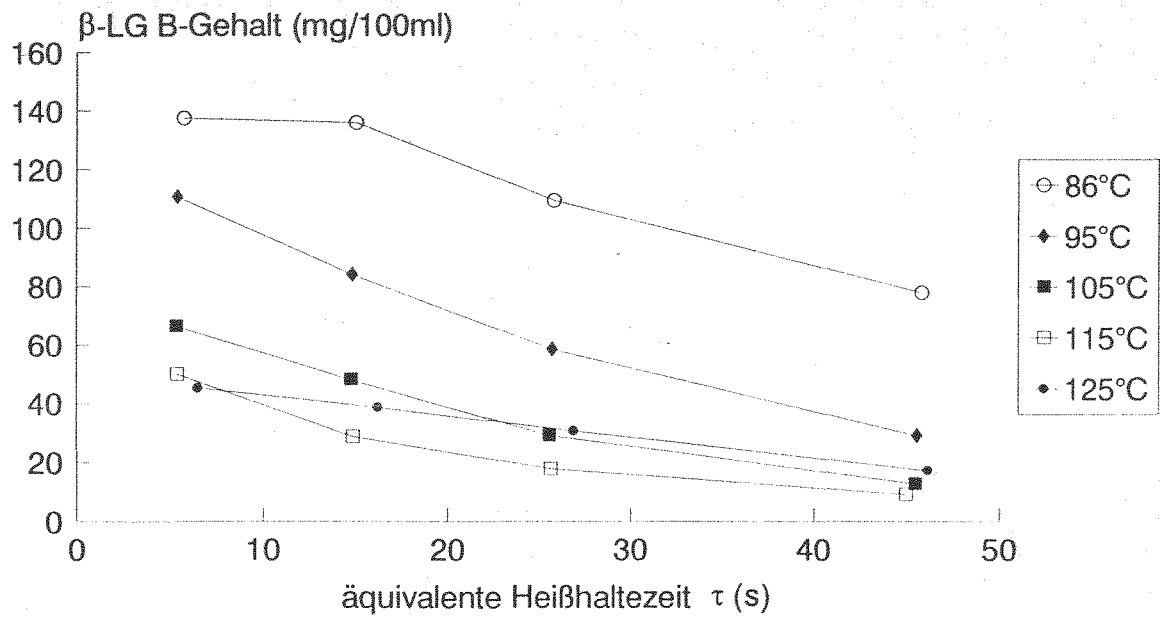


Abb. 10:  $\beta$ -Lactoglobulin B-Gehalt in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

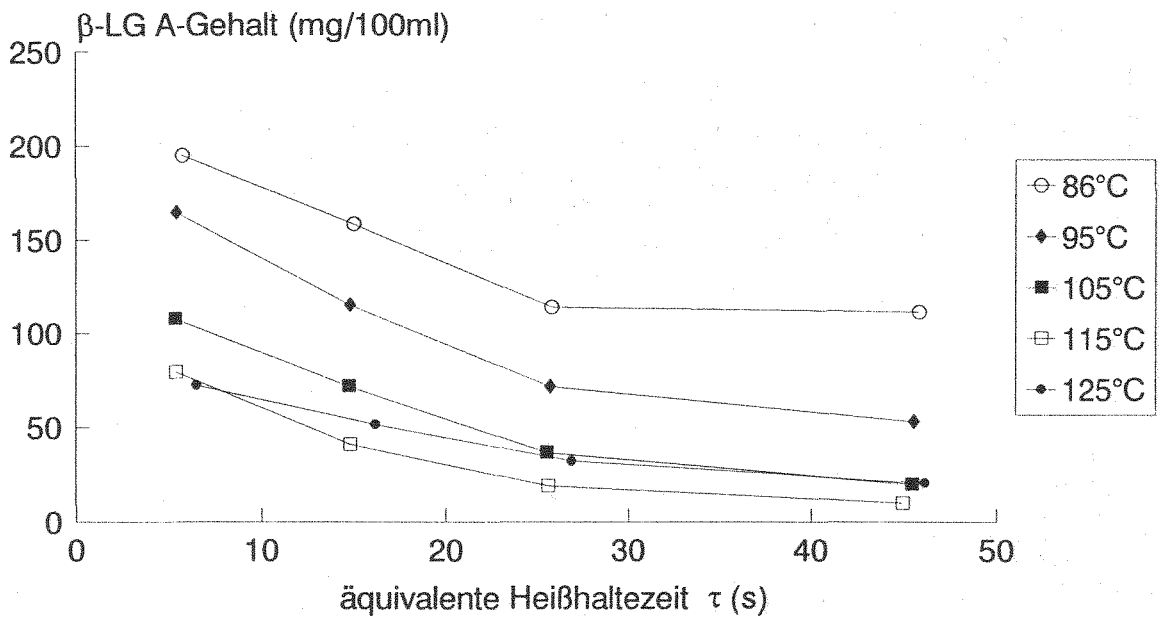


Abb. 11:  $\beta$ -Lactoglobulin A-Gehalt in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit von der äquivalenten Heißhaltezeit

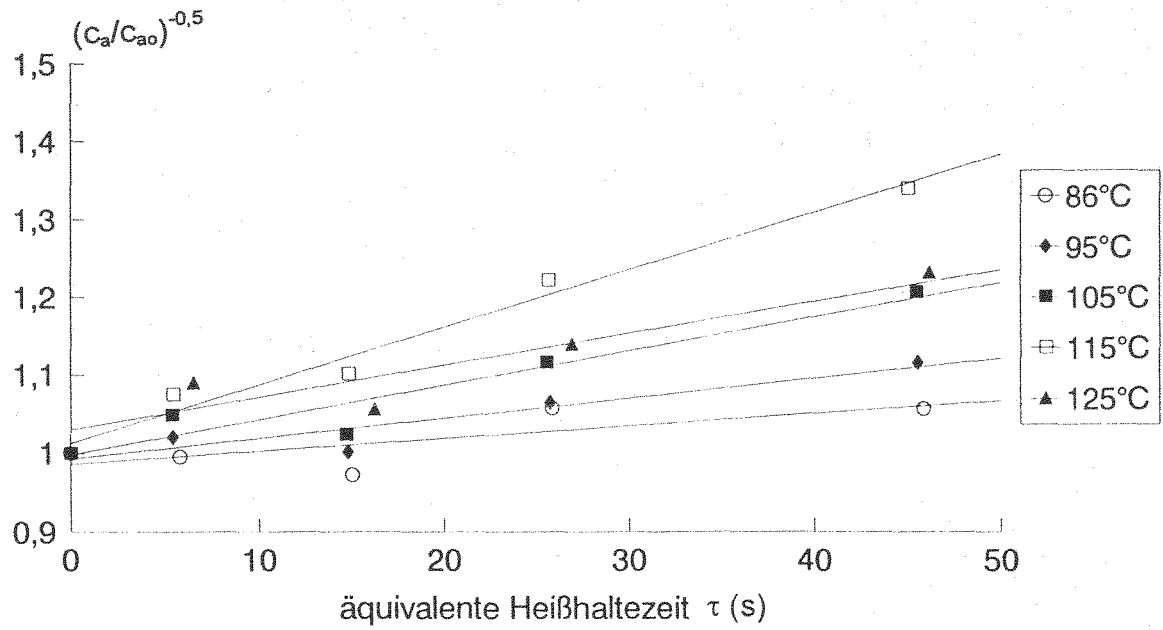


Abb. 12: Anteil an denaturiertem  $\alpha$ -Lactalbumin in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugrundelegung einer Reaktionsordnung  $n = 1,5$

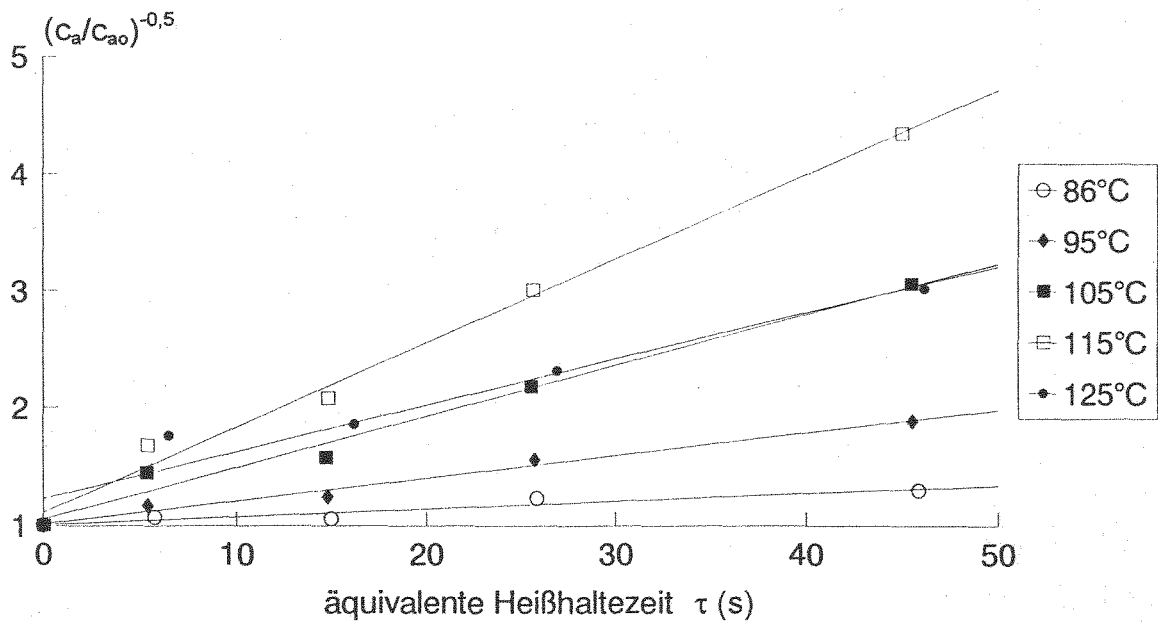


Abb. 13: Anteil an denaturiertem  $\beta$ -Lactoglobulin A in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugrundelegung einer Reaktionsordnung  $n = 1,5$

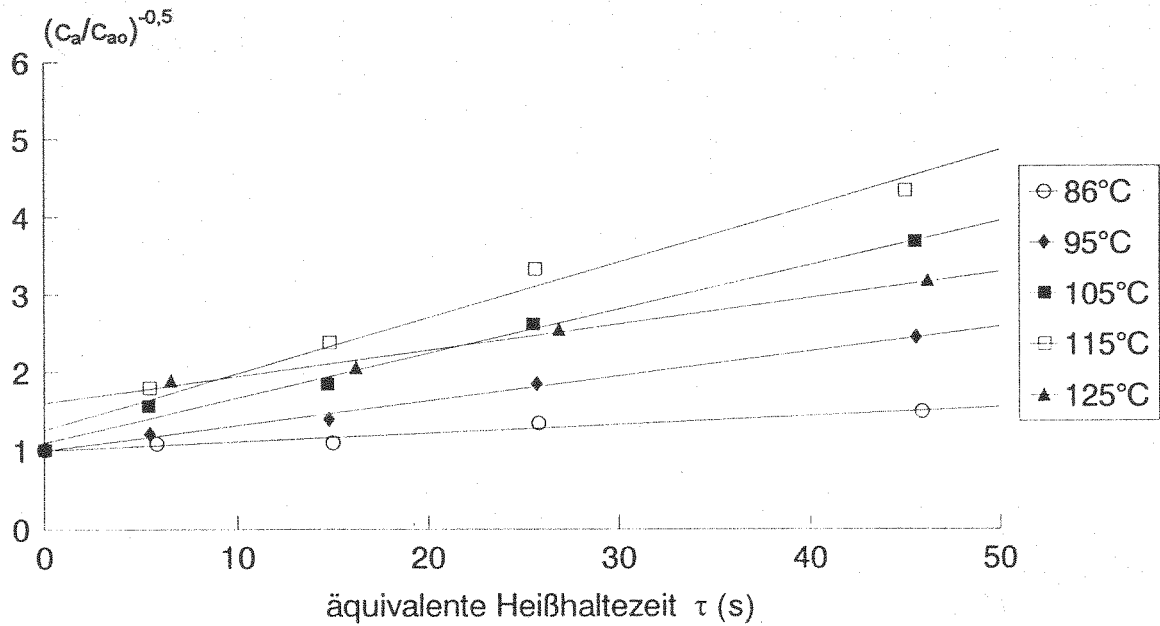


Abb. 14: Anteil an denaturiertem  $\beta$ -Lactoglobulin B in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugrundelegung einer Reaktionsordnung  $n = 1,5$

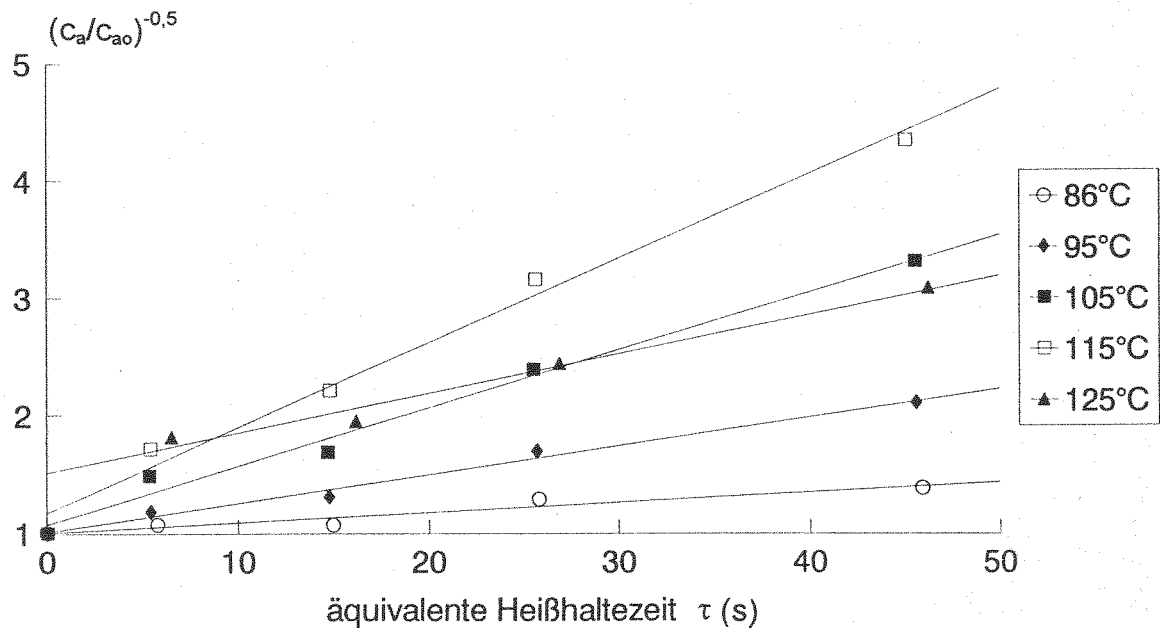


Abb. 15: Anteil an denaturiertem  $\beta$ -Lactoglobulin in Milchproben des HE-Bereiches bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugrundelegung einer Reaktionsordnung  $n = 1,5$

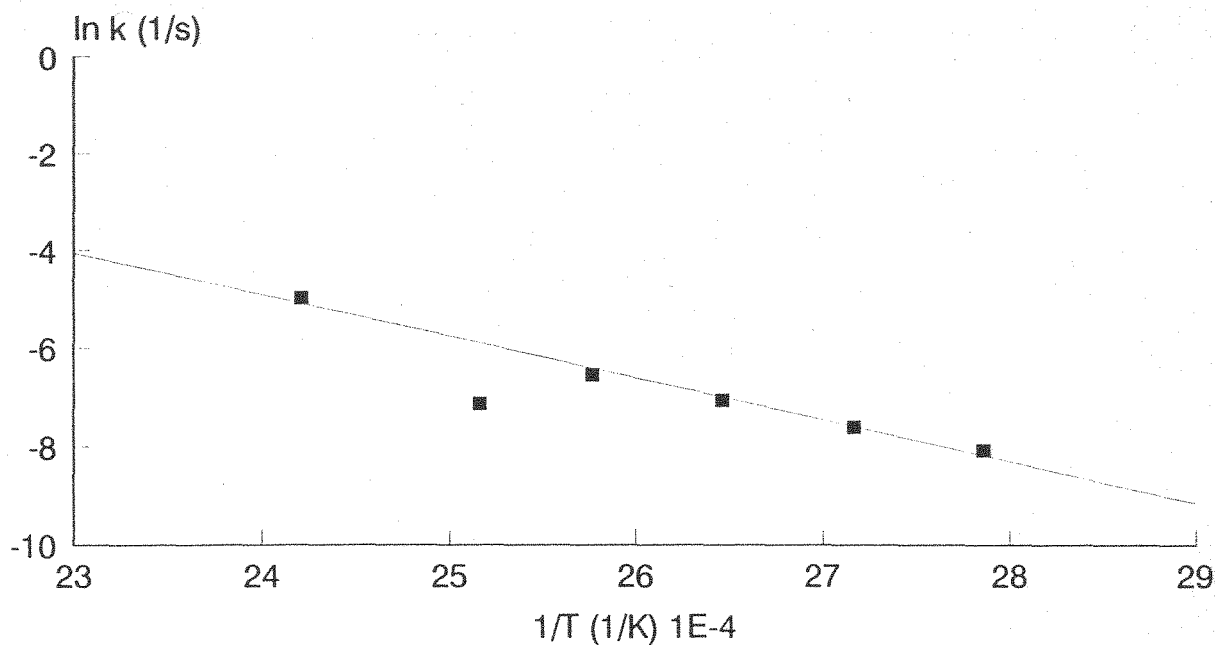


Abb. 16: Arrheniusplot für die  $\alpha$ -Lactalbumin-Denaturierung

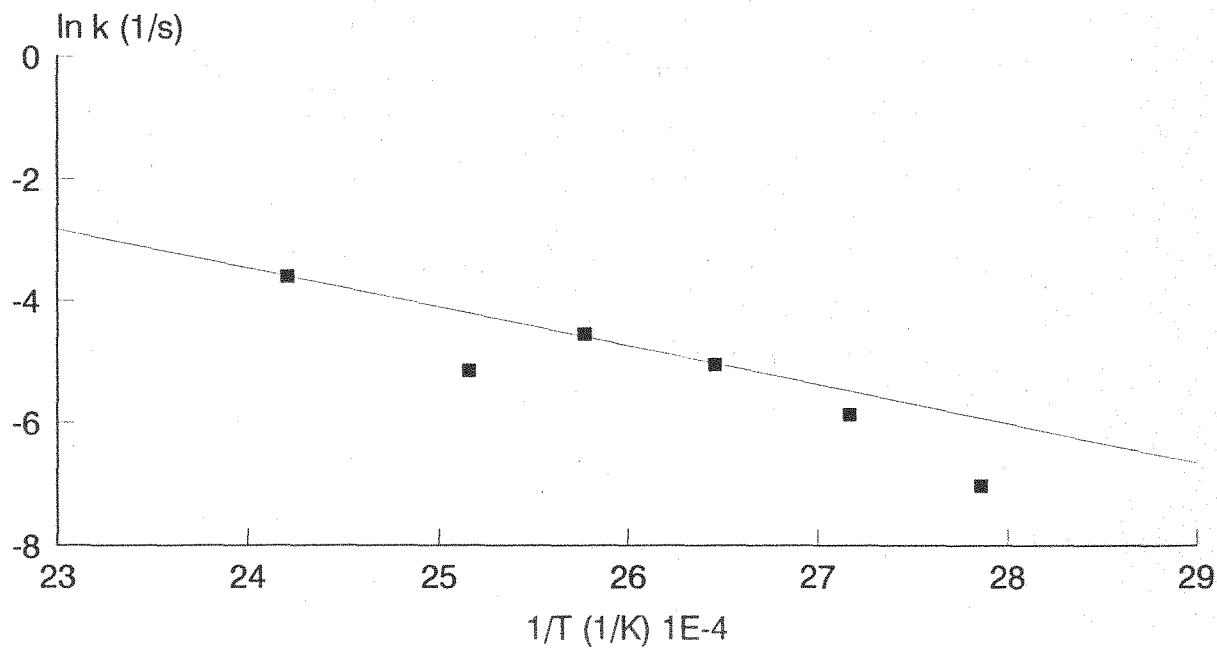


Abb. 17: Arrheniusplot für die  $\beta$ -Lactoglobulin A-Denaturierung



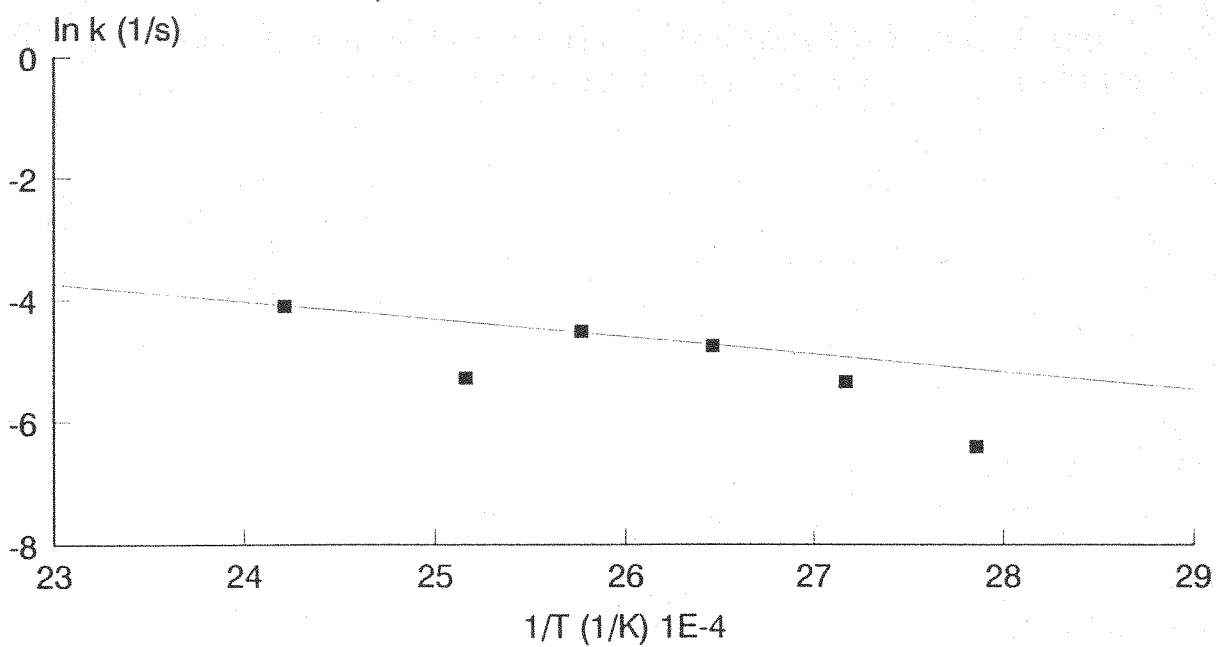


Abb. 18: Arrheniusplot für die  $\beta$ -Lactoglobulin B-Denaturierung

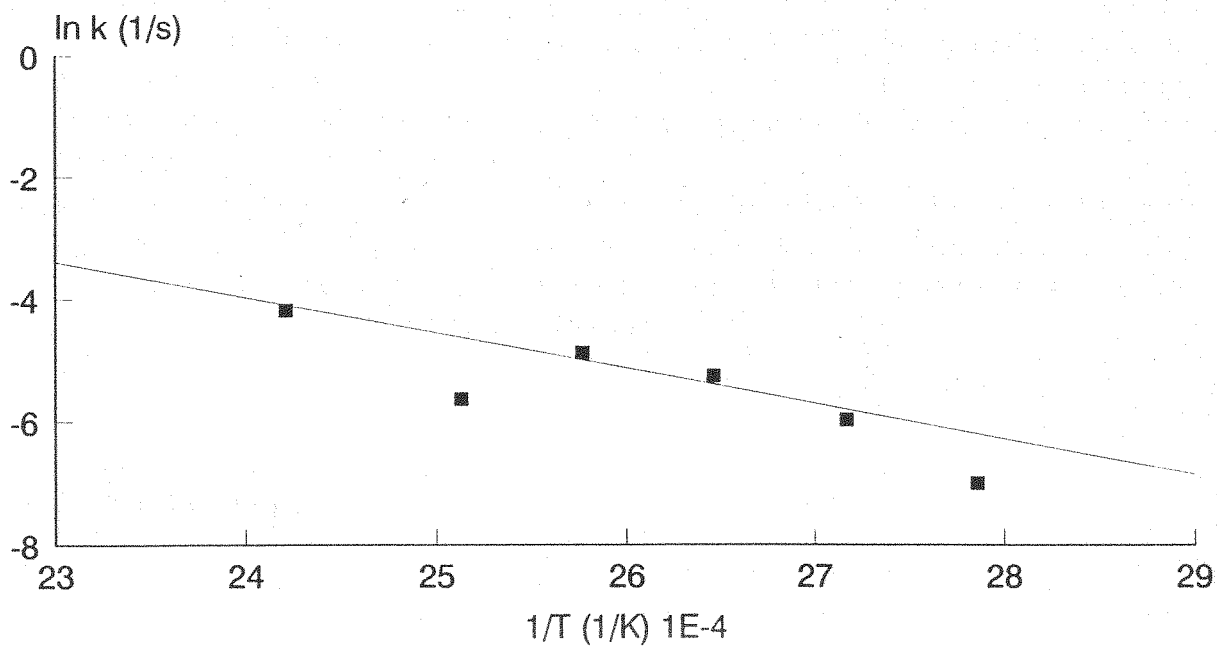


Abb. 19: Arrheniusplot für die  $\beta$ -Lactoglobulin-Denaturierung